



Identification de nouveaux transcrits alternatifs du gène CD20 humain, différentiellement exprimés dans les hémopathies impliquant le lymphocyte B

Clementine Gamonet

► To cite this version:

Clementine Gamonet. Identification de nouveaux transcrits alternatifs du gène CD20 humain, différentiellement exprimés dans les hémopathies impliquant le lymphocyte B. Génétique humaine. Université de Franche-Comté, 2015. Français. NNT : 2015BESA3003 . tel-01334855

HAL Id: tel-01334855

<https://theses.hal.science/tel-01334855>

Submitted on 21 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ
UFR SCIENCES MÉDICALES ET PHARMACEUTIQUES
ÉCOLE DOCTORALE HOMME ENVIRONNEMENT SANTÉ
Année universitaire 2014-2015

THÈSE

**Pour l'obtention du diplôme de
Doctorat de l'Université de Franche-Comté**
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Par Clémentine GAMONET

Identification de nouveaux transcrits alternatifs du gène CD20 humain,
différentiellement exprimés dans les hémopathies impliquant le
lymphocyte B

Sous la direction du Dr Christophe FERRAND
Et la codirection du Dr Marina DESCHAMPS

Soutenue le 12 Octobre 2015

Composition du jury

Directeur de thèse : Dr Christophe FERRAND
Codirecteur de thèse : Dr Marina DESCHAMPS

Rapporteurs : Pr Pierre FEUGIER
Dr Alexandra MARTINS

Examineurs : Pr Eric DECONINCK
Pr Olivier ADOTEVI
Dr Bernard DRENOU

Liberté, Égalité, Fraternité



REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont au Docteur Christophe Ferrand, mon directeur de thèse, qui m'a épaulé depuis ma première année de master jusqu'à la fin de cette thèse, ainsi qu'au Docteur Marina Deschamps ma co-directrice de thèse. Merci à vous de m'avoir guidé durant mon apprentissage du métier de chercheur.

Je tiens ensuite à remercier les membres du jury qui ont jugé ce travail :

Le Professeur Erick Deconinck qui a accepté de présider ce jury,

Le Professeur Pierre Feugier et le docteur Alexandra Martins qui ont consacré du temps à la lecture et la critique de mon manuscrit,

Le Professeur Olivier Adotévi et le Docteur Bernard Drénou qui ont expertisé ce travail.

Merci au Professeur Christophe Borg de m'avoir accueilli dans son équipe il y a plus de 6 ans maintenant, et à l'ensemble des chercheurs de l'unité pour leurs conseils avisés durant toutes ces années : merci aux Professeurs Philippe Saas, Olivier Adotévi, Francine Garnache-Ottou et aux Docteurs Sylvain Perruche et Yann Godet.

Merci également à Carole qui m'a présenté ce cher delta-CD20 et appris à le connaître !

Merci à Anne et Charline, qui ont accepté la longue et fastidieuse tâche de relecture et correction de mon manuscrit.

Merci à mes supers collègues grâce à qui les moments compliqués de la vie de chercheur sont si vite oubliés :

Elodie, ça n'a pas pâtassé depuis qu'on se connaît, et tout a été bien plus facile avec toi à mes côtés. J'avais bloqué mon 27 Mars, je bloquerai d'autres dates s'il le faut, et je serai là comme tu l'as été pour moi.

Anne Dup', mon point de repère au grand bureau ! Toujours là pour me secourir en biomol et pour me remonter le moral quand « ya rien qui sort en PCR », merci.

JR, Jean-Marie, Idir, mes acolytes sportifs. On a refait de nombreux matchs ensemble autour d'un petit force 5, 7 ou 10 pour le plus énervé d'entre nous. Quel plaisir de partager ces petits moments avec vous !

Merci à tous mes collègues, en particulier Sabéha, Fanny, Pat', Francis, « Rérémy », Yann, Romain(s) L et V, Laurent, Afag ainsi que tous ceux qui rendent l'ambiance de travail si agréable dans cette unité.

Mais une thèse ne se joue pas qu'au labo, loin de là.

Alors un immense merci à mes amis, qui m'ont toujours permis de m'évader en toutes circonstances, et continueront de le faire j'en suis sûre.

Baptiste, Laurène, Marion, vous êtes loin et me manquez. Mais savoir que vous êtes là pour moi a toujours été (et reste) très précieux. Merci d'être là.

Bastien, JB, Flo, Stef, où que l'on soit, quoi que l'on fasse, les moments que l'on passe ensemble sont à chaque fois plus drôles et plus agréables que les précédents, et j'espère que ça continuera très longtemps comme ça. Merci d'être mes amis !

Merci à tous les lanceurs de disques, de Besançon et d'ailleurs. Ce sport m'a accompagné durant toute ma thèse, et a largement contribué à mon équilibre durant ces années. Une pensée spéciale pour Alex, mon compère de « galère » cette dernière année. Salbris, rédac', coaching, ce ne fut pas toujours simple mais c'était nettement plus drôle de partager ça avec toi.

Enfin, je garde le meilleur pour la fin afin de remercier ma famille. Ce n'est pas facile, car jamais je ne pourrai les remercier assez.

Papis, Mamis, vous sentir les quatre si fiers de moi me rend très heureuse, et moi, je suis fière d'être votre petite fille.

Merci à mes petits frères Timothée et Etienne, ma tatie Céline, Nina, Jeanne : les piliers de ma vie. Merci d'être près de moi.

Papa, Maman, vous m'avez donné le goût des études et toujours encouragé à continuer. Grâce à votre indéfectible aide, soutien, et bien plus encore, je suis arrivée au bout de ce long chemin universitaire. Vous avez toujours cru en moi et avez toujours tout fait pour me faciliter la vie. Je vous aime fort.

Enfin, toi mon amoureux, merci d'être là avec moi, de m'avoir soutenu et d'avoir patienté à mes côtés durant ces mois plus compliqués.

RESUME

L'existence d'un épissage alternatif du gène *cd20* dans les lymphocytes B tumoraux, conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée nommée Δ CD20 (puis D393-CD20), a été découverte au laboratoire en 2010. L'expression de D393-CD20 avait alors été associée à des cas de résistance au traitement par Rituximab, un AcMo anti-CD20.

L'objectif de ces travaux de thèse a alors été de caractériser l'épissage de *cd20*, et de déterminer l'implication de D393-CD20 dans l'acquisition de résistance au RTX.

Plusieurs modèles *in vitro* de résistance aux AcMo ont été mis en place afin d'évaluer la corrélation entre l'expression de D393-CD20 et la sensibilité aux anti-CD20.

Le séquençage de produits de PCR spécifique de CD20 a permis d'identifier 4 variants alternatifs en plus de D393-CD20, nommés D657-, D618-, D480- et D177-CD20 en raison de leurs tailles. Pour tous, le cadre de lecture est conservé malgré la perte d'une portion de *cd20*.

L'expression des 5 variants alternatifs a été évaluée par PCR à partir de prélèvements de patients atteints de pathologies B auto-immunes et cancéreuses, ainsi que chez des donneurs sains. L'épissage de *cd20* dérégulé au sein des lymphocytes B tumoraux ainsi que lors d'une transformation par le virus EBV a été mis en évidence, de même qu'une dérégulation plus modérée lors de la survenue de pathologies auto-immunes.

Si les modèles *in vitro* de résistance démontrent que la présence de D393-CD20 n'est pas directement associée à la résistance aux AcMo, nous avons montré que ces derniers peuvent moduler l'épissage de *cd20* par l'intermédiaire de voies de signalisation intra cellulaires.

D393-CD20 est pour le moment le seul variant pour lequel une protéine codée soit formellement identifiée, et son expression est directement associée à l'oncogenèse. L'identification de lymphocytes TCD4 spécifiques de cette protéine au cours de ces travaux rend possible le développement d'une stratégie d'immunothérapie ciblant D393-CD20.

Ces résultats ouvrent donc la voie à une étude plus approfondie du potentiel biomarqueur et du rôle pronostique de la dérégulation de l'épissage du gène codant CD20, cible prépondérante des stratégies thérapeutiques des pathologies impliquant le lymphocyte B.

SOMMAIRE

RESUME	7
SOMMAIRE	9
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES ABRÉVIATIONS	15
INTRODUCTION	19
CHAPITRE 1 : LA PROTEINE CD20, MARQUEUR DES LYMPHOCYTES B	21
I. L'ontogénie B.....	21
I.1 Le développement du linéage B.....	21
I.1.1 De la cellule souche au LB mature naïf	21
I.1.2 L'activation des LB naïfs	22
I.1.2a Maturation des LB folliculaires	23
I.1.2b Développement des plasmocytes	25
I.1.2c Développement des LB-MEM	26
I.2 Spécificité des Lymphocytes B pour l'antigène	27
I.2.1 Réarrangement des gènes du BCR	27
I.2.2 Hypermutations somatiques.....	29
I.2.3 Commutation de classe ou switch isotypique	31
II. La molécule CD20	34
II.1 Découverte et expression	34
II.2 Le gène CD20	34
II.3 La protéine CD20	35
II.3.1 Structure	35
II.3.2 Fonctions.....	36
II.3.2a Signalisation du BCR et flux calcique	36
II.3.2b CD20, BCR et flux calcique.....	39
CHAPITRE 2 : LE RITUXIMAB ET AUTRES ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-CD20	41
I. Hémopathies B	41
I.1 Lymphomes B.....	41
I.1.1 Événements oncogéniques au cours du développement des LB	41
I.1.1a Les translocations.....	41
I.1.1b Les mutations	44
I.1.2 Transformation virale par le virus Epstein Barr (EBV)	44

I.2 La LLC	47
I.2.1 Les anomalies génétiques marqueurs et facteurs pronostiques de la maladie	47
I.2.2 Les traitements de la LLC	47
I.3 Les maladies auto-immunes (MAI)	48
II. Les AcMo anti-CD20	50
II.1 Historique de l'avènement du RTX	50
II.2 Mécanismes d'action du RTX	52
II.2.1 Les FcR.....	52
II.2.2 La phagocytose et la neutralisation de pathogènes.....	52
II.2.3 L'ADCC.....	53
II.2.4 L'activation du complément	55
II.2.5 La mort cellulaire directe (transduction de signaux).....	57
II.2.5a L'induction d'apoptose.....	57
II.2.5b Le blocage des voies de survie	61
II.3 Développement de nouveaux AcMo.....	62
II.3.1 Les mécanismes de résistance au RTX	62
II.3.1a La modulation d'expression de CD20	62
• Epigénétique	63
• Élimination des complexes CD20-RTX de la surface membranaire	63
II.3.1b L'altération du recrutement des effecteurs	64
II.3.1c Les modulations des voies de signalisation	64
II.3.2 Le développement de nouveaux AcMo.....	65
CHAPITRE 3 : L'ÉPISSAGE ALTERNATIF	69
I. L'épissage constitutif et alternatif.....	69
I.1 L'épissage.....	69
I.2 L'épissage alternatif	70
I.3 Le spliceosome.....	72
II. La régulation de l'épissage	75
II.1 L'épissage dépend de caractéristiques intrinsèques du pré-ARNm	75
II.1.1 La taille des exons et introns.....	75
II.1.2 La force de la séquence.....	75
II.1.3 La structure secondaire du pré-ARNm	76
II.2 L'action des protéines régulatrices	76
II.2.1 Les protéines de la famille SR.....	77
II.2.1a Structure.....	77
II.2.1b Fonction	78
II.2.2 Les protéines de la famille hnRNP	80
II.2.2a Structure.....	80
II.2.2b Fonctions.....	81

II.2.3 Les voies de signalisation régulant l'épissage	83
III. Épissage alternatif et cancer	86
III.1 Les aberrations de l'épissage au cours de l'oncogenèse	87
III.1.1 Les anomalies des séquences régulatrices (mutations)	87
III.1.2 Les anomalies des protéines de l'épissage	89
III.1.2a SF3B1	89
III.1.2b SRSF1	90
III.1.2c hnRNP	90
III.1.3 Les anomalies des modifications post-traductionnelles	91
III.2 Les conséquences des aberrations de l'épissage	93
III.2.1 L'avantage prolifératif	93
III.2.2 La résistance aux traitements	95
III.3 Outils diagnostiques et thérapeutiques	96
III.3.1 Les variants alternatifs spécifiques des cancers peuvent-ils être utilisés comme outils diagnostiques ?	96
III.3.2 Le blocage et la reprogrammation de l'épissage	97
III.3.3 Les variants alternatifs peuvent être ciblés à des fins thérapeutiques	101
RATIONNEL DE LA THESE	103
RÉSULTATS	107
DONNÉES PUBLIÉES	109
Identification of new CD20 alternative splice variants differentially expressed in hematological malignancies	111
Lack of expression of an alternative CD20 transcript variant in circulating B cells from patients with pemphigus	139
The alternative CD20 transcript variant is not a surrogate marker for resistance to rituximab in patients with rheumatoid arthritis	143
CD20 alternative splicing isoform generates immunogenic CD4 helper T epitopes	147
DONNÉES NON PUBLIÉES	161
I. Matériel et Méthodes	162
I.1 Echantillons biologiques, patients et lignées cellulaires	162
I.2 Mise en place de lignées résistantes	162
I.3 Traitements	162
I.4 Etude biochimique : Western Blotting, Immunoprécipitation, Fractionnement Sub cellulaire et extraction des radeaux lipidiques	163
I.5 Etude moléculaire: Extraction de l'ARN, reverse transcription, PCR	164
II. Résultats	164
II.1 La protéine tronquée D393-CD20 est associée avec WT-CD20 au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique.	164

II.2 Aucune corrélation ne peut être établie entre l'expression de D393-CD20 et l'acquisition de résistance aux AcMo.	165
II.3 Le traitement par RTX augmente l'expression de D393-CD20	168
III. Discussion	170
DISCUSSION	173
1. L'épissage de <i>cd20</i> est modulé lors d'hémopathies B	175
1.1 Cinq épissages alternatifs sont différemment exprimés lors de la survenue d'hémopathie	175
1.2 Les causes d'une modulation de l'épissage de <i>cd20</i>	177
1.2.1 L'AID, une protéine clé de l'oncogenèse	177
1.2.2 Dérégulation de l'épissage lors de l'activation de l'AID	178
1.3 Le variant alternatif D393-CD20 est associé à la transformation maligne	178
2. Conséquences possibles de la dérégulation de l'épissage	180
2.1 L'épissage de <i>cd20</i> comme facteur prédictif des LLC	181
2.2 Implication dans l'échappement tumoral	182
2.3 Développement d'immunothérapie ciblant les variants	183
Conclusions et perspectives	185
BIBLIOGRAPHIE	187

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Développement schématique des lymphocytes B	22
Figure 2: Développement des cellules sécrétrices d'anticorps	25
Figure 3: Structure des loci des chaînes lourdes d'immunoglobuline humaine avant et après réarrangement	28
Figure 4: Structure des loci des chaînes lourdes d'immunoglobuline humaine avant et après réarrangement	29
Figure 5: Mécanisme d'hypermutations somatiques.....	30
Figure 6: Les isotypes d'immunoglobulines	32
Figure 7: La commutation de classe	33
Figure 8: Signalisation du récepteur à l'antigène des lymphocytes B (BCR)	37
Figure 9: Flux calcique déclenché par l'activation du BCR	39
Figure 10: Anomalies génétiques à l'origine de lymphomes B	42
Figure 11: Implication des antigènes de latence dans la transformation maligne associée à l'EBV.....	45
Figure 12: Conséquences de la dégranulation des cellules Natural Killer (NK).....	54
Figure 13: Les différentes voies d'activation du complément	56
Figure 14: Formation du Complexe d'attaque membranaire (CAM) par le système du complément	57
Figure 15: Les voies d'apoptoses extrinsèque et mitochondriale (ou intrinsèque)	59
Figure 16: Mort cellulaire apoptotique et non-apoptotique	61
Figure 17: Deux réactions de trans-estérification permettent l'excision d'un intron.....	70
Figure 18: Différents types d'épissage alternatif	71
Figure 19: Séquence et structure des snRNA du spliceosome humain.....	72
Figure 20: Assemblage du spliceosome et catalyse de l'épissage.....	73
Figure 21: Structure schématique des protéines de la famille SR.....	78
Figure 22: Modes d'action des protéines SR.....	79
Figure 23: Structure schématique des protéines snRNP	81
Figure 24: Modes d'action des protéines hnRNP	82
Figure 25: La phosphorylation régule l'activité des protéines SR	84
Figure 26: La méthylation de l'ADN module l'épissage.....	86
Figure 27: Mécanisme de dégradation des ARNm non-sens (NMD).....	88

Figure 28: L'épissage du gène codant le VEGF conduit à la synthèse de 2 familles d'isoformes.....	94
Figure 29: Schéma d'une molécule de pré-trans-épissage	99
Figure 30: Western Blotting anti-CD20 après Immunoprécipitation (IP) anti-CD20, fractionnement sub-cellulaire et extraction des radeaux lipidiques.....	165
Figure 31: Sensibilité aux AcMo anti-CD20 des lignées résistantes. Exemple de la lignée Raji.	166
Figure 32: Expression de WT- et D393-CD20 par les lignées Raji sauvages (WT) et résistantes aux AcMo RTX, OFA et GA101	166
Figure 33: Expression de WT-CD20 à la surface des lignées Résistantes. Exemple de la lignée Raji	167
Figure 34: expression de D393-CD20 au cours de la culture.....	167
Figure 35: Expression de WT- et D393-CD20 après traitement de PBMC par RTX	168
Figure 36: Expression de WT- et D393-CD20 après traitement de lignée B par RTX	169
Figure 37: Expression de WT- et D393-CD20 après inhibition d'AKT préalable au traitement de PBMC par RTX.....	169

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

AA : Acide Aminé

AcMo : Anticorps Monoclonal

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AID : Activation –Induced Deaminase = déaminase à activation induite

APE : Apurinic/aPyrimidinic Endonuclease = endonuclease apurinique/apyrimidique

APRIL: A Proliferation-Inducing Ligand = ligand inductible par la prolifération

ARN : Acide RiboNucléique

B

BAFF: B-cell activating factor

BCR : B-Cell Receptor = récepteur des cellules B

C

CD : cluster de différenciation

CDR : complementarity determining region = région déterminant la complémentarité

CG: Centre Germinatif

CHOP : Cyclophosphamide, Hydrodaunorubicine, Oncovin et Prednisone

CMH: Complexe Majeur d’Histocompatibilité

C-ter : C-terminale

D

DAG : DiAcylGlycérol

DC: Cellules Dendritiques

DCf : Cellules Dendritiques Folliculaires

DLBCL : Diffuse Large B-Cell Lymphoma= lymphome B diffus à grandes cellules

dNTP : désoxyribonucléotides

E

EBV : Epstein-Barr Virus

EJC : Exon Joining Complex

EMA : European Medicine Agency

ESE : Exonic Splicing Enhancer

ESS : Exonic Splicing Silencer

EXO: Exonucléase

F

FADD : FAS Associated Death Domain

Fc : Fragment cristallisable

FcR : Récepteur au fragment Fc

FDA : Food and Drug Administration = Agence américaine des produits alimentaires et de santé

H

HAT : Histone Acétyl-Transférase

HDAC : Histone DéAcétylase

hnRNP : heterogenous nuclear RiboNucleoProtein = ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes

I

IFN : InterFéRon

Ig : Immunoglobuline

IgH : chaîne lourde de l'Ig

IL: InterLeukine

IP3 : Inositol-1,4,5-triPhosphate

IRF: Interferon Regulatory Factor

ISE : Intronic Splicing Enhancer

ISS : Intronic Splicing Silencer

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif

L

LB : Lymphocyte B

LB-FO : Lymphocyte B Folliculaire

LB-MEM: Lymphocyte B Mémoire

LB-T: Lymphocyte B Transitionnel

LB-ZM : Lymphocyte B de la Zone Marginale

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LT : Lymphocyte T

M

MNI : MonoNucléose Infectieuse

MAI : Maladie Auto-Immune

MMR : MisMatch Repair

N

NEJH : Non-Homologous End Joining = complexe de jonction non-homologue

NK: Natural Killer

N-ter : N-terminale

O

OFA : Ofatumumab

OLS : Organisme Lymphoïde Secondaire

P

PIP : PhosphatidyInositol-4,5-diPhosphate

PMT : Molécule de Pré-Trans-épissage

pré-ARNm : ARN pré-messager

R

R: Récepteur

RAG: Recombination-Activating Gene = gene activant la recombinaison

R-CHOP : Rituximab + Cyclophosphamide, Hydrodaunorubicine, Oncovin et Prednisone

RRM : RNA-recognition motif

RSS : Recombination Signal Sequences = séquences signales de recombinaison

RTX : Rituximab

S

snRNA : small nuclear RNA

snRNP : small nuclear RiboNucleoProtéin

SOA : Séquences Oligonucléotidiques Antisens

SOCE : Store-Operated Calcium Entry = entrée de calcium basée sur les réserves

SR : Sérine Arginine

T

TLR: Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

U

UNG : Uracil-DNA Glycosylase

INTRODUCTION

Chapitre 1 : La protéine CD20, marqueur des lymphocytes B

I. L'ontogénie B

I.1 Le développement du linéage B

I.1.1 De la cellule souche au LB mature naïf

Le développement des LB débute, comme toutes les cellules hématopoïétiques, au sein de la moelle osseuse. La cellule souche à l'origine des leucocytes est le **progéniteur multipotent** qui sous la dépendance du facteur de transcription Pu.1 se différencie en précurseur myéloïde commun ou en **précurseur lymphoïde précoce** (Scott et al., 1994) (Fig 1).

Une fois engagées dans la voie lymphoïde, les cellules évoluent en **précurseur lymphoïde multipotent** à partir duquel peuvent être produits des lymphocytes T, B, Natural Killer (NK) et les cellules dendritiques (DC). La différenciation vers les LB au détriment des NK et DC est conditionnée par l'IL-7 (Tsapogas et al., 2011).

Les précurseurs sont alors nommés « **pro-B** », et une étape cruciale du développement de LB débute : les gènes codant les chaînes des immunoglobulines sont réarrangés par les enzymes recombinases RAG1 et RAG2 avant d'être transcrits (Grundy et al., 2009) (Askary et al., 2014). Ce mécanisme qui permet l'expression d'une grande variabilité de récepteur des cellules B (BCR) au sein d'une population de LB, tout en gardant une très haute spécificité de ces récepteurs pour leurs antigènes respectifs, sera détaillé plus loin.

Au stade **pré-B**, le gène codant la chaîne lourde de l'IgM (Ig μ) est réarrangé. Une fois exprimée, la chaîne lourde est associée avec une chaîne temporaire VpreB/ λ 5 formant ainsi le pré-BCR (Burrows et al., 2002). L'exclusion allélique est alors enclenchée de manière à ce que le second chromosome ne soit pas réarrangé inutilement : il le sera uniquement si les réarrangements du premier allèle ne permettent pas l'expression d'une chaîne lourde fonctionnelle.

La chaîne légère de l'Ig est à son tour réarrangée et exprimée à la place de la chaîne temporaire : le BCR ainsi assemblé et exprimé à la surface cellulaire définit le stade de **LB immature**. Dans la moelle osseuse, les LB sont en présence d'antigènes du soi circulant ou présentés par les cellules stromales. Les LB répondant à ces auto-antigènes sont considérés comme auto-réactifs et sont éliminés. Les LB survivants

quittent la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine afin de coloniser la rate et les autres organismes lymphoïdes (Fig 1).

Le dernier stade de maturation des LB est marqué par la co-expression de deux types d'Ig membranaires : les **lymphocytes B matures naïfs** expriment à la fois des IgM et des IgD grâce à un épissage alternatif du gène codant la chaîne lourde des Ig (Enders et al., 2014). Ces LB sont prêts à répondre efficacement à un antigène et ils quittent la moelle osseuse pour entrer dans la circulation sanguine. Ces LB circulants parfois appelés **transitionnels** (LB-T) ont la capacité de coloniser le sang, la rate mais également la moelle osseuse afin de rencontrer l'antigène dont ils sont spécifiques.

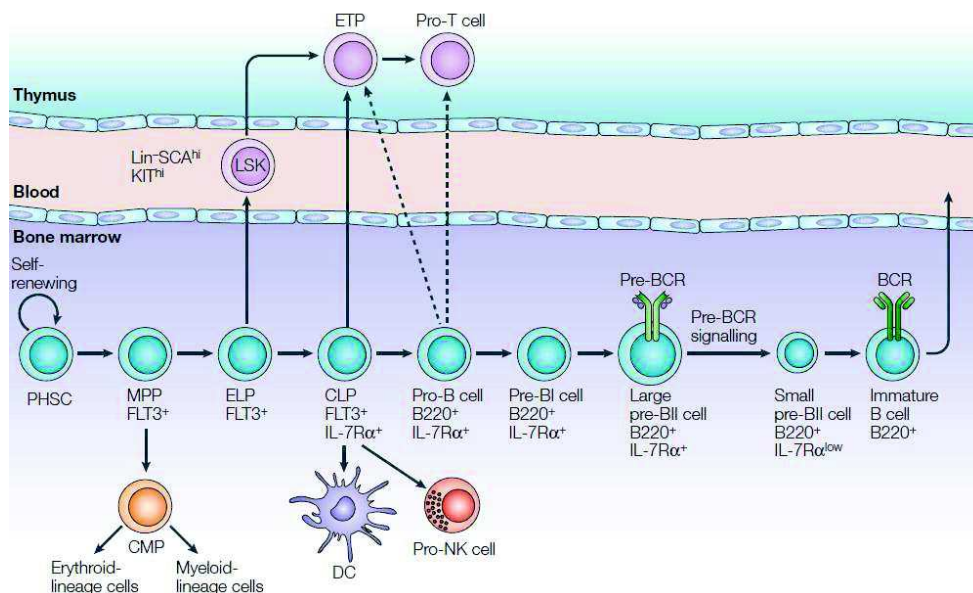


Figure 1: Développement schématique des lymphocytes B

Les flèches en trait continu correspondent à des voies de développement confirmées, contrairement aux flèches en pointillés. Les cellules souches pluripotentes hématopoïétiques (PHSC), les progéniteurs multipotents (MPP), les précurseurs lymphoïdes précoces (ELP) et les précurseurs lymphoïdes communs (CLP) sont définis par un phénotype Lin^{-} c'est-à-dire qu'ils n'expriment aucun marqueur associé aux lignées matures CD3, CD8, B220, CD11b, CD19, GR1 et TER119. Les pro-B et pré-BI sont définis par les phénotypes $B220^+/CD43^+$ et $B220^+/CD43^{-}$ respectivement puis l'expression d'un pré-BCR caractérise le stade pré-BII. Enfin, un BCR fonctionnel est exprimé sur les LB immatures qui quittent alors la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine.

D'après Matthias & Rolink, Nat Rev Immunol 2005

I.1.2 L'activation des LB naïfs

Une fois dans les organismes lymphoïdes secondaires (OLS), la suite du développement des LB est conditionnée par la rencontre avec l'antigène qui va provoquer la différenciation des LB-T

IgM^{hi}IgD^{hi}CD21^{int}CD23⁺ en 3 populations distinctes : les LB folliculaires (LB-FO), les LB de la zone marginale (LB-ZM) et les LB non-conventionnels B-1.

La survie des LB-T est conditionnée par la stimulation du récepteur à l'antigène (BCR) par un antigène du soi. En cas de forte réponse du BCR, la protéine Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) (Cariappa et al., 2001) est activée et module deux voies de signalisation responsables de l'orientation vers une différenciation en **LB-FO**. En revanche, une faible stimulation du BCR n'active pas BTK, ce qui permet une activation de la signalisation via la protéine NOTCH-2, orientant la différenciation vers les **LB-ZM** (Saito et al., 2003).

Cette théorie d'une différenciation B dépendante de l'intensité de réponse du BCR a été validée par de nombreux modèles murins : l'inactivation de CD21 (une protéine activatrice du BCR) induit une augmentation de LB-ZM au détriment des LB-FO alors que l'inverse est observé chez des souris dont l'inhibiteur CD22 du BCR n'est pas exprimé (Cariappa et al., 2001).

Les LB-FO représentent 80% des LB de la rate et constituent les centres germinatifs (CG) en proliférant suite à la rencontre avec l'antigène. Ils possèdent alors la capacité de se différencier en plasmocytes sécréteurs d'IgM à courte durée de vie.

Les **LB-ZM** quant à eux sont à même de répondre aux pathogènes sanguins de manière T-indépendante, et vont également collaborer avec les cellules NK invariant pour répondre aux antigènes lipidiques grâce à l'expression de CD1d (Bialecki et al., 2009). Ces LB sont les premières cellules B sécrétrices d'anticorps au cours d'une réponse immunologique, permettant ainsi de faire le lien entre immunité innée et immunité adaptative.

I.1.2a Maturation des LB folliculaires

Au sein des OLS, les LB naïfs migrent vers la zone-B sous l'influence de CXCL13 et s'accumulent au niveau de follicules lymphoïdes en attendant la rencontre avec leur antigène. Les antigènes reconnus peuvent être solubles ou fixés à la membrane de DC, cellules dendritiques folliculaires (DCf) ou de macrophages. Suite à la fixation d'antigène sur le BCR, ce dernier est internalisé et l'antigène dégradé pour être présenté à la surface de LB via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II.

Les LB ainsi partiellement activés migrent vers la bordure des follicules à proximité de la zone riche en LT sous influence des cytokines CCL19 et CCL21 reconnues par le récepteur CCR7 des LB.

Les LB présentent ensuite le peptide chargé sur leurs molécules de CMH II à un LT spécifique du même peptide. La synapse qui se crée lors de cette interaction permet un échange de signaux nécessaire à la complète activation du lymphocyte B : la reconnaissance de l'antigène constitue le premier signal

d'activation du LB puis l'engagement de CD40 et de CD28 par respectivement CD40L et B7.1/ B7.2 est nécessaire pour la poursuite de la réponse B (Chevrier et al., 2012).

Certains antigènes ont la capacité d'activer les LB en absence de LT : ces antigènes sont en général de grosses molécules polysaccharidiques ou lipidiques capables de d'activer en même temps plusieurs molécules du BCR. Ce fort signal, associé à la stimulation de récepteurs Toll-like (TLR), permet l'activation du LB sans nécessiter une co-stimulation par un LT.

Une fois activés, les LB se divisent en 2 sous-populations.

Une première migre à l'extérieur des follicules, où ils prolifèrent et se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps de faible affinité appelés **plasmoblastes** à courte durée de vie permettant une réponse rapide à l'antigène.

La seconde sous-population, nommée **centroblaste**, retourne à l'intérieur des follicules pour débiter une phase de forte prolifération formant les CG (Bannard et al., 2013). Après avoir achevé leur intense prolifération les centroblastes subissent le processus d'hypermutations somatiques afin de modifier l'affinité des BCR pour l'antigène dont ils sont spécifiques et deviennent des **centrocytes**. Suite à ces modifications, les centrocytes expriment plusieurs facteurs pro-apoptotiques qui provoquent une apoptose systématique si le BCR n'est pas rapidement stimulé par son antigène spécifique (Siepmann et al., 2001). Les cellules ainsi sélectionnées vont devoir survivre à une seconde étape de sélection : leur survie dépend de l'engagement de CD40 par le CD40L exprimé par les lymphocytes T présents dans les CG (T-GC). Là encore, seuls les LB aux BCR les plus affins survivront. Afin de garantir une réponse immunitaire efficace, différentes chaînes lourdes peuvent être synthétisées par un LB de manière à obtenir des Ig de même spécificité antigénique, mais aux propriétés effectrices variées : ce processus appelé commutation de classe sera détaillé ci-après.

La dernière étape du développement des LB consiste en la différenciation des centrocytes en **plasmocytes** sécréteurs d'anticorps ou en **LB mémoires (LB-MEM)** (Fig 2). Ce devenir est déterminé par l'expression entre autre du gène *pax5*, qui en cas de répression conduit à la production de plasmoblastes alors qu'une surexpression conduit à une production de LB-MEM.

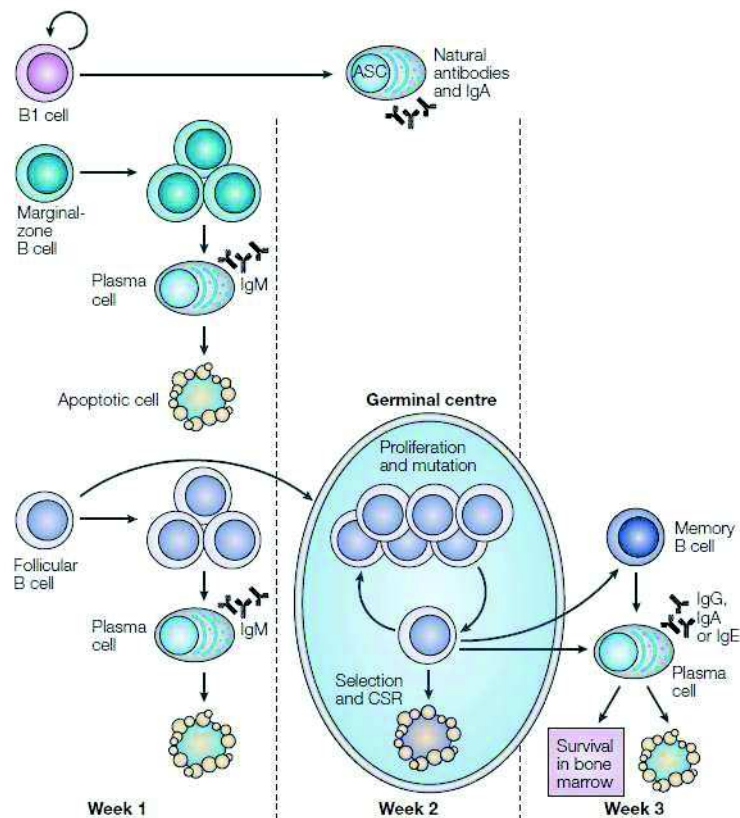


Figure 2: Développement des cellules sécrétrices d'anticorps

Les cellules sécrétrices d'anticorps (ASC) produites à partir de cellules B1 sécrètent des anticorps (Ac) dits « naturels » indépendamment d'une rencontre avec un antigène. Les LB de la zone marginale peuvent se transformer en plasmocytes sécréteurs d'IgM dès la première semaine suivant la rencontre avec l'antigène puis meurent rapidement par apoptose. Après rencontre avec un antigène les LB folliculaires prolifèrent dans les CG et subissent une commutation de classe avant de se développer en plasmocytes sécréteurs d'anticorps ou en LB-MEM au cours de la 3^{ème} semaine de réponse à un antigène.

D'après Shapiro-Selef & Calame, Nat Rev Immunol 2005

I.1.2b Développement des plasmocytes

Les plasmocytes sont les seules cellules de l'organisme capables de sécréter des Ac, et sont à ce titre primordial pour l'efficacité d'une réponse immunitaire. Les plasmocytes peuvent dériver de LB-ZM, LB-FO, de LB activés dans les CG mais également de LB-MEM. Le premier stade de différenciation des cellules sécrétrices d'anticorps est le **plasmoblaste**, caractérisé par une sécrétion d'anticorps en faible quantité associée à une capacité de prolifération et d'apprêtement d'antigènes aux LT.

Trois facteurs de transcription sont nécessaires à la maturation des plasmoblastes en plasmocytes sécréteurs d'une grande quantité d'anticorps constituant le stade terminal de différenciation des LB :

BLIMP1, IRF4 et XBP1 (Klein et al., 2006). L'engagement de CD40 et la sécrétion d'IL-2 activent les voies de permettant la sécrétion des Ig et l'arrêt du cycle cellulaire.

Une fois activés, les plasmocytes sécrètent de fortes quantités d'Ig de différentes classes. Ces Ig circulent à travers tout l'organisme à la recherche de l'antigène dont ils sont spécifiques. L'antigène est ainsi ciblé par le système immunitaire en particulier par le système du complément et les phagocytes dont nous développerons les modes d'action dans le chapitre II.

Les plasmocytes ont une durée de vie d'environ deux semaines dans la rate, mais des cellules sécrétrices d'anticorps sont observées dans la moelle osseuse jusqu'à 1 an après une infection signifiant que la moelle osseuse est le site d'une production à long terme d'anticorps. Cette production est le fruit de la migration d'une sous population de plasmocytes vers la moelle osseuse grâce à un cocktail de cytokines.

I.1.2c Développement des LB-MEM

À la suite d'une réponse immunitaire, le système immunitaire garde en mémoire cette réponse pendant plusieurs années de manière à pouvoir répondre très rapidement et efficacement en cas de nouvelle infection par le même antigène. Cette fonction est possible grâce aux cellules LB-MEM qui sont des LB quiescents à longue durée de vie ayant la capacité de proliférer et de se différencier en plasmocytes très rapidement suite à la seconde rencontre avec un antigène à faible dose. Un des marqueurs phénotypique des LB-MEM est l'expression de CD27.

Ces cellules sont principalement localisées au sein des OLS et ne nécessitent pas d'interaction avec les LT pour être pleinement activées lors d'une seconde infection. Plusieurs sous populations de LB-MEM ont été identifiées et deux voies distinctes de développement de ces populations se dégagent selon si la réponse primaire était dépendante ou non d'une stimulation par les LT (Berkowska et al., 2011).

Une partie des LB-MEM se développe au niveau des CG à partir de centrocytes ayant largement proliféré et subi les maturations d'affinité du BCR et les commutations de classe.

Ces LB-MEM issus des CG (LB-MEM_{GC}) sont caractérisés par une expression variée d'Ig membranaires de hautes affinités et sont différenciés des LB naïfs et des LB-CG par l'expression des marqueurs PD-L1, PD-L2, CD80 et CD73. Les plasmocytes à longue durée de vie (LLPC) participent également à la mémoire immunitaire puisqu'après une première activation ils poursuivent durant plusieurs années la sécrétion constitutive d'anticorps spécifiques de l'antigène. En revanche, ils n'ont pas les propriétés nécessaires au déclenchement d'une nouvelle réponse: ils n'expriment que peu de molécules de BCR à leur surface, et ne

peuvent proliférer. Ce sont donc les anticorps qu'ils sécrètent qui participent à la seconde réponse en fixant rapidement les antigènes circulant et permettant leur dégradation.

I.2 Spécificité des Lymphocytes B pour l'antigène

L'efficacité des LB dépend de sa capacité à reconnaître des millions de pathogènes différents grâce à une grande variabilité de son BCR. Alors que le génome humain est composé d'environ 10^5 gènes, plusieurs dizaines de millions d'Ig différentes doivent composer le répertoire B.

Trois principaux mécanismes participant à l'élaboration d'un répertoire B diversifié et spécifique ont été découverts : le **réarrangement des gènes** codant les Ig permet une large diversité de BCR, les **hypermutations somatiques** conduisent à la production de LB hautement affins pour leurs antigènes, et la **commutation de classe** garantissant une réponse efficace contre un antigène en permettant la production d'anticorps spécifiques du même épitope mais aux propriétés effectrices variées.

I.2.1 Réarrangement des gènes du BCR

Le réarrangement des gènes codant les Ig du BCR a lieu dans la moelle osseuse au cours du développement des LB. Les Ig membranaires sont composées de deux chaînes lourdes et de deux légères similaires entre elles associées par des ponts disulfures (Fig 6). Chaque chaîne est composée d'une région constante (C) spécifiant la classe d'Ig à laquelle l'anticorps membranaire appartient, et d'une région variable (V) spécifique de l'antigène.

Les gènes codant la chaîne lourde sont situés sur le chromosome 14 (Pott et al., 2013) et sont réarrangés au stade pro-B alors que ceux codant les chaînes légères kappa (κ) et lambda (λ) sont respectivement localisés sur les chromosomes 2 et 22 (Martín-Subero et al., 2002) et sont réarrangés au stade pré-B.

La région variable de la chaîne lourde humaine est composée de nombreux segments géniques, répartis en 3 loci nommés : V (pour Variabilité), D (pour Diversité) et J (pour Jonction) ce qui correspond à 84 segments potentiellement utilisables pour coder la région variable de la chaîne lourde de l'Ig (51V, 27D et 6J)(Berg et al., 2002). Au niveau des chaînes légères les segments D n'existent pas, réduisant le nombre de segments fonctionnels à 34 pour λ (30V et 4J) et 45 pour κ (40V et 5J) (Berg et al., 2002) (Fig 3).

L'association d'un fragment de chaque type (VDJ pour la chaîne lourde et VJ pour les chaînes légères) est nécessaire pour obtenir un gène fonctionnel. Ce réarrangement est dépendant des enzymes activatrices de la recombinaison des gènes (RAG-1 et RAG-2) (Fig 4).

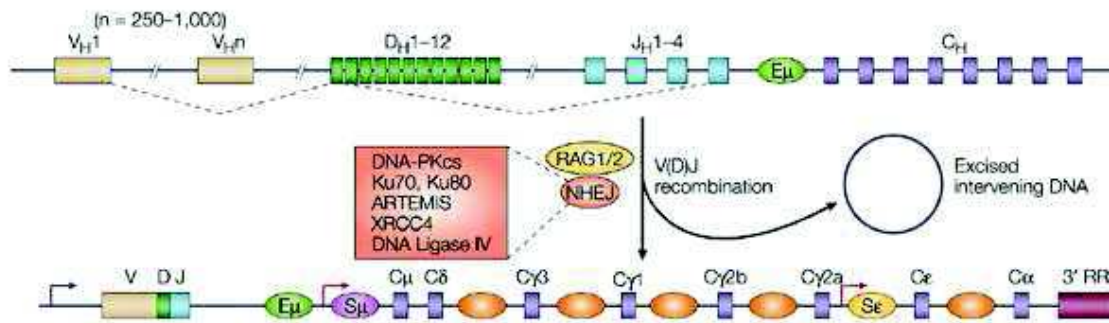


Figure 3: Structure des loci des chaînes lourdes d'immunoglobuline humaine avant et après réarrangement

Le locus est arrangé en segments variables (V), de diversité (D), de jonction (J) et constants (C). L'activation d'enzymes recombinases (RAG) puis du mécanisme de jonction d'extrémités non-homologue (NHEJ) permet d'accoler un segment V, un D et un J qui ensemble coderont la portion variable du BCR.

Adapté de Chaudhuri & Alt, Nat Rev Immunol 2004

Le réarrangement correspond pour la chaîne lourde à la jonction aléatoire d'un fragment D à un fragment J puis la jonction du fragment D-J nouvellement constitué avec un fragment V. Pour la chaîne légère, seuls un fragment V et un J sont joints. Ces fragments V(D)J composent une fois accolés un exon qui sera à son tour joint à l'exon codant la portion constante, situé en aval sur le même chromosome (Fig 3).

Le réarrangement est guidée par des séquences signales de recombinaison (RSS) qui flanquent chaque fragment. Le complexe RAG (RAG-1 + RAG-2) réalise une cassure sur un brin d'acide désoxyribonucléique (ADN) à la jonction de la portion codante et de la séquence RSS ce qui permet une réaction de trans-estérification conduisant à une cassure double brin de l'ADN et à la formation d'une extrémité « en épingle à cheveux » (Fig 4).

La jonction des extrémités laissées ainsi libres nécessite l'activation de la voie de signalisation de jonction d'extrémités non homologues (NEJH). La jonction est opérée par une endonucléase qui ajoute des nucléotides aux extrémités de chaque brin jusqu'à ce qu'un appariement soit possible (Hofle et al., 2000). Ces éliminations et ajouts de nucléotides contribuent largement à la diversité des BCR puisqu'ils modifient aléatoirement les zones de jonctions entre les segments V, D et J permettant ainsi la création d'une infinité de portions variables d'Ig possibles.

Dès qu'un appariement entre les deux fragments est possible, les quelques nucléotides restant non appariés sont dégradés, et la portion codante de la région variable de l'Ig est ainsi constituée.

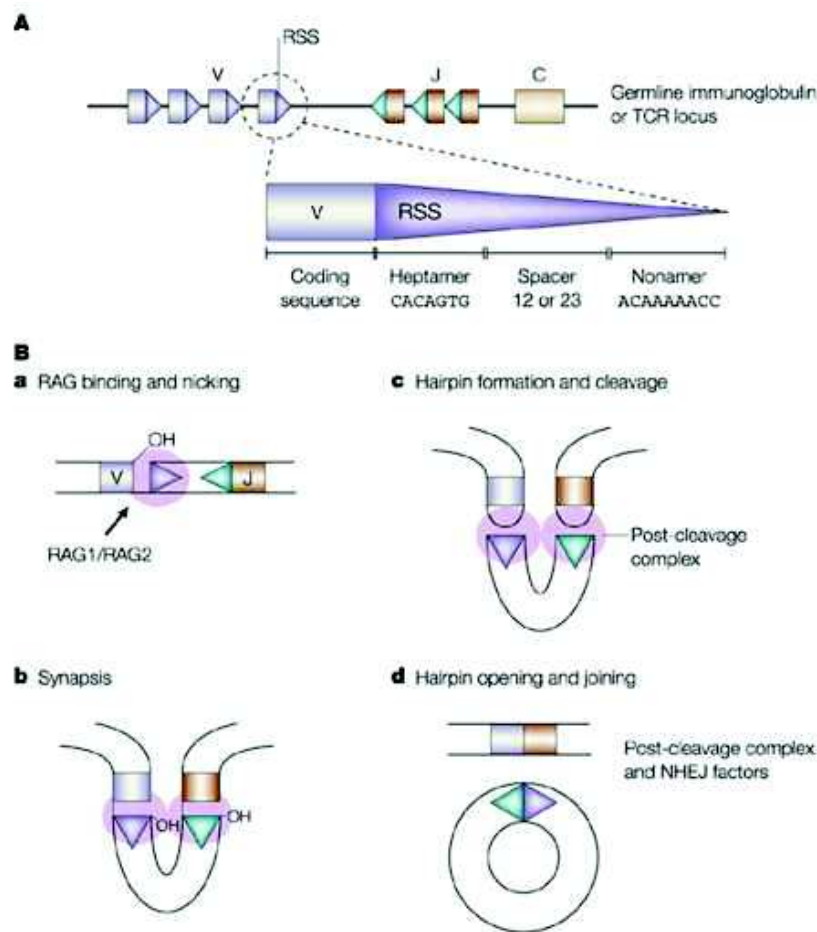


Figure 4: Les étapes du réarrangement V(D)J

La séquence signal de recombinaison (RSS) est accolée à l'extrémité 3' d'un domaine V et en 5' du domaine J (A). Les enzymes RAG créent une brèche aux jonctions V-RSS et RSS-J (B-a) qui sont rapprochées pour créer une synapse (B-b). Une réaction de trans-estérification forme des structures « en épingle à cheveux » aux extrémités V et J (B-c) que le complexe NEJH accole (B-d).

D'après Roth et al, Nat Rev Immunol 2003

I.2.2 Hypermutations somatiques

Le réarrangement des gènes permet la production d'un répertoire très large de récepteurs à l'antigène. De nouvelles modifications vont devoir être réalisées après la rencontre avec l'antigène spécifique de manière à encore diversifier le répertoire mais également accentuer la spécificité du BCR pour l'épitope. Ces mutations, appelées hypermutations somatiques ont lieu au cours de la réplication des centrocytes au sein des CG grâce à une enzyme désaminase AID (activation-induced deaminase). Ces mutations sont engendrées au niveau des régions variables des chaînes du BCR, dans une région de 2Kpb autour de la région V(D)J (Odegard and Schatz, 2006).

La première phase de ce phénomène consiste en la désamination par l'AID d'une base déoxycytidine (C) en déoxyuracile (U) (Muramatsu et al., 1999) transformant ainsi un appariement C:G en U:G. Cette anomalie provoque l'intervention de la machinerie de réparation de l'ADN.

La base U, anormalement présente dans l'ADN, peut être éliminée par l'Uracil-DNA glycosylase (UNG) et remplacée aléatoirement par l'un des 4 dNTP grâce à une ADN polymérase (Fig 5).

L'anomalie U:G causée par l'AID peut également être reconnue par une autre composante de la machinerie de réparation de l'ADN, nommée mismatch repair (MMR) : l'hétérodimère MSH2-MSH6 reconnaît le mésappariement, se fixe à l'ADN au niveau de l'anomalie et recrute l'exonucléase 1 (EXO-1) qui dégrade les portions d'ADN anormales (Christmann et al., 2003). Afin de réparer l'ADN, une ADN polymérase de faible fidélité (ADNpol η) synthétise un nouveau brin d'ADN, porteur de nombreuses mutations au niveau des paires A:T.

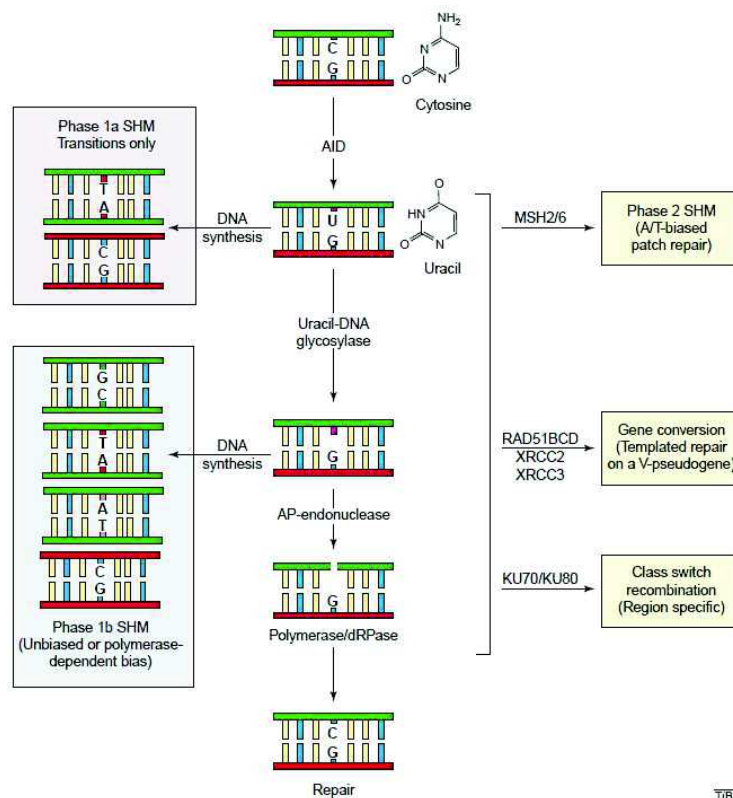


Figure 5: Mécanisme d'hypermutations somatiques

L'enzyme AID (activation-induced deaminase) transforme une base cytosine (C) en uracile (U) par désamination entraînant une mutation. La base anormale peut être excisée par l'uracil-DNA glycosylase ou le système mismatch repair (MSH-2/6) et être remplacée aléatoirement, générant là aussi une mutation sauf si une AP-endonucléase puis une polymérase interviennent pour réincorporer une base C.

Adapté de Neuberger et al, Trends Biochem 2003

La survenue de mutations à haute fréquence (1/1.000pb comparée à 1/1.000.000pb lors d'une réplication normale) conduit à la synthèse d'Ig aux régions variables légèrement modifiées. Les LB seront ensuite sélectionnés selon leur affinité pour l'antigène : dans les CG, les cellules dendritiques folliculaires (DCf) captent et présentent à leur surface des antigènes sous forme de complexes immuns. Ils sont ensuite reconnus et apprêtés par les LB qui à leur tour les présentent au LTf qui envoient en retour aux LB un signal de survie (Allen et al., 2007). Les LB les plus affins captent plus rapidement les antigènes, les présentent en plus grande quantité et plus rapidement via leurs CMHII et sont donc les seuls à recevoir un signal de survie de la part des LT_{FH}.

I.2.3 Commutation de classe ou switch isotypique

Les anticorps sécrétés sont capitaux pour l'efficacité de la réponse immunitaire grâce à leurs actions de neutralisation des pathogènes reconnus et de recrutement d'effecteurs immunitaires permettant l'éradication du pathogène.

Cinq classes d'Ig existent : IgM, IgD, IgG, IgA et IgE (Xu et al., 2012) (Fig 6). Ces Ig, bien que de structures similaires, présentent des fonctions effectrices différentes. Les IgM, sous forme pentamérique, sont les premiers détectables lors d'une réponse immunitaire.

Les IgG sont les Ig majoritaires dans le sang et dans l'espace extravasculaire. Quatre sous types d'Ig existent (IgG1 à 4), et permettent une élimination très efficace des pathogènes sanguins notamment les virus et bactéries. Les IgE sont concentrées dans les muqueuses où elles induisent le relargage d'histamine par les mastocytes et sont impliquées dans les réactions allergiques (Gould and Sutton, 2008). Enfin, les IgA sont spécialisées dans l'élimination des bactéries au sein des muqueuses (Woof and Kerr, 2004), de la peau, et sont présents dans les sécrétions glandulaires (mucus, colostrom entre autres).

Les 5 classes d'Ig sont déterminées par la portion constante de la chaîne lourde dont les différences de structure confèrent aux différentes classes d'Ig des propriétés effectrices.

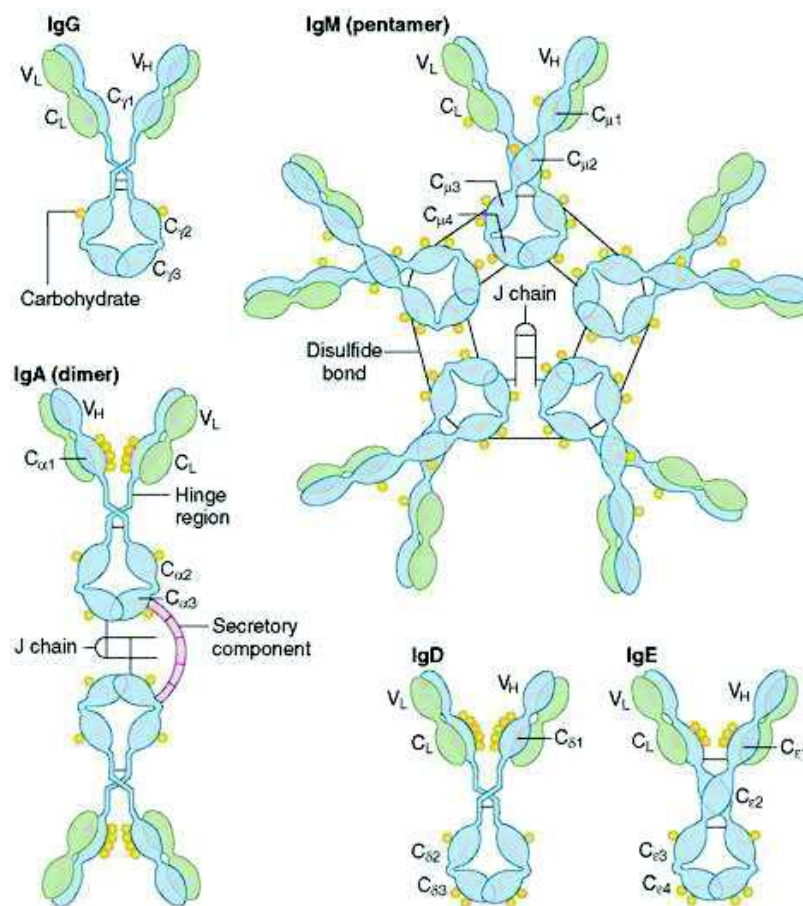


Figure 6: Les isotypes d'immunoglobulines

Chaque immunoglobuline est composée d'au moins 2 chaînes lourdes (V_H , en bleu) et 2 chaînes légères (V_L , en vert) associées entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures. Les IgG, IgA, IgE et IgD ont deux domaines par chaîne légère et 4 par chaîne lourde. Les IgA sont le plus souvent associés en dimères par une chaîne J entre les premiers domaines constants de chaque monomère. Les IgM sont le plus souvent sous forme pentamérique liés par 4 liaisons disulfides ainsi que par une chaîne J. D'après Actor et al, Immunology and Microbiology Chapter 3

Alors que les LB naïfs n'expriment à leur surface que des IgM et IgD, différents types d'Ig sont exprimés puis sécrétés au cours de la réponse immunitaire (Hennig et al., 2014).

Nous avons vu précédemment que le gène codant les Ig était constitué de plusieurs fragments géniques codant les régions variable et constante. Les portions codant les 5 différentes régions constantes μ , δ , α , ϵ et γ sont placées en aval du fragment VDJ réarrangé (Fig 7). Au cours du développement des LB, seul le domaine μ est utilisé. Le domaine δ est utilisé à partir du moment où le LB quitte la moelle osseuse pour rejoindre les OLS par un épissage alternatif du gène IgH : une petite région répétée riche en G entre C_μ et C_δ peut parfois constituer un site accepteur cryptique pour S_μ médiant une commutation de classe non canonique par épissage alternatif (Arpin et al., 1998) (Enders et al., 2014).

Suite à la rencontre avec l'antigène, les domaines constants γ , ϵ et α doivent être exprimés pour permettre l'expression d'IgG, IgE et IgA à la place des IgM et IgD exprimés par les LB naïfs.

Cela résulte de la commutation de classe qui consiste à remplacer le gène codant la partie constante de la chaîne lourde C_μ par un gène codant une autre partie constante, telle que C_γ , C_α ou C_ϵ (Fig 7) (Chaudhuri et al., 2007)(Xu et al., 2012).

Chaque portion génique codant une partie constante d'Ig est précédée d'une région dite de « switch (S) » de 1 à 10kb constituée d'une séquence riche en C/G répétée. La commutation se fait entre deux sites S, un donneur et un accepteur, au cours de la réplication de l'ADN grâce à l'enzyme AID déjà impliquée dans le processus de SHM vu précédemment. L'AID agit sur l'ADN simple brin et nécessite donc l'ouverture de la double hélice d'ADN au moment de la transcription.

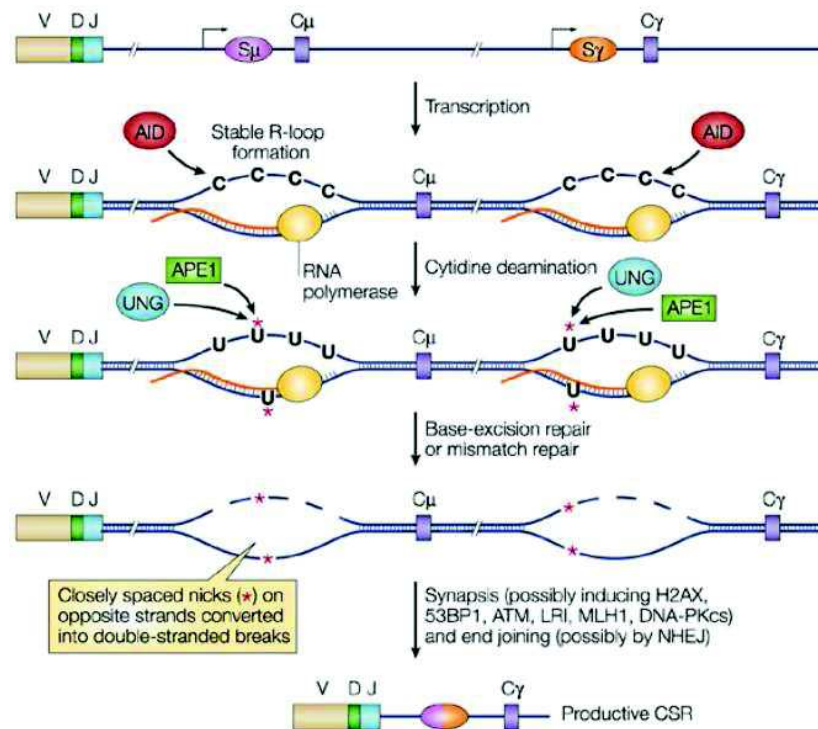


Figure 7: La commutation de classe

L'AID (activation-induced deaminase) désamine les résidus cytidine des régions switch. L'action du complexe de réparation de l'ADN provoque des cassures double brins par excision des bases anormales. Les extrémités sont alors liées entre elles par le complexe de jonction non-homologue (NHEJ) accolant le domaine VDJ au domaine constant en aval de la région switch désaminée. D'après Chaudhuri & Alt, Nat Rev Immunol 2004

La déamination par l'AID de plusieurs bases C au sein des séquences C/G répétées conduit à la formation de nombreux appariements U:G (Maul et al., 2011). La machinerie de réparation de l'ADN intervient alors, la base U est éliminée ce qui conduit à une cassure double brin de l'ADN.

Lorsqu'une cassure double brin a lieu dans deux régions S, l'ADN entre ces deux régions est excisé et les deux régions S accolées et jointes.

L'induction du switch isotypique dépend de plusieurs signaux envoyés par l'environnement des centrocytes. L'expression de l'AID est activée lors de la rencontre avec le LT dans le cas d'un antigène T-dépendant, ou suite à l'activation de plusieurs BCR simultanément dans le cas d'un antigène T-indépendant. L'activation de TLR et de récepteurs de la famille des Tumor Necrosis Factor Receptor (TNF-R) tels que BAFF-R, TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cytophilin interactor) et BCMA (B cell maturation antigen) participe également à cette activation (Castigli et al., 2005).

II. La molécule CD20

II.1 Découverte et expression

En 1980, un anticorps spécifique des lymphocytes B a été découvert par l'équipe de Schlossman et Stashenko grâce à l'immunisation de souris par des cellules tumorales issues d'un lymphome de Burkitt. Cet anticorps, appelé anti-B1, a permis de mettre en évidence l'antigène CD20, nouveau marqueur spécifique des lymphocytes B (Stashenko et al., 1980).

L'expression de CD20 débute au stade pré-B du développement des LB et se termine au stade plasmoblaste : les cellules pro-B et plasmocytes sont CD20⁻ (Yamamura and Miyake, 2012).

De manière intéressante, cet antigène est conservé sur les LB tumoraux de leucémies et lymphomes, ce qui en a rapidement fait une cible thérapeutique potentielle (Nadler et al., 1981).

Bien que CD20 soit considéré depuis sa découverte comme un marqueur de la lignée B, quelques cas de lymphocytes T exprimant faiblement le CD20 ont été observés (Takami et al., 1998) (Sun et al., 2004) mais l'existence des LT CD3⁺ CD20⁺ demeure controversée (Henry et al., 2010).

II.2 Le gène CD20

Le gène CD20 humain est localisé sur le chromosome 11 dans la région q12-q13 au sein d'un cluster de gènes appartenant à la famille MS4A (Tedder et al., 1989a). Cette famille regroupe 16 gènes (Zuccolo et

al., 2010) codant des protéines transmembranaires de séquences et structures similaires à CD20. Les plus connues outre CD20 sont la sous-unité du récepteur de haute affinité pour les IgE codée par le gène *ms4a2*, et la protéine adaptatrice HTM4 impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et codée par *ms4a3*. Les séquences codant ces protéines présentent une forte homologie de séquences entre elles, principalement concernant les portions codant les 3 premiers segments transmembranaires. Cette homologie suggère une évolution de ces gènes depuis un précurseur commun.

Le gène *cd20*, également nommé *ms4a1*, a une taille de 15 kb et est composé de 8 exons. Le premier contient plusieurs sites d'initiation de transcription potentiels conduisant à des pré-ARNm de tailles différentes. Trois ARNm matures ont par ailleurs été observés. L'ARNm majoritaire a une taille de 2.8Kb et est composé des exons I, II et III en totalité. Deux ARNm alternatifs résultant de la présence de différents sites d'épissage en 5' ont également été décrits (Tedder et al., 1989b) : l'un de 2.6Kb formé de l'exon I et de la seconde moitié de l'exon III, et un de 3.4Kb contenant en plus des exons I, II et III une large portion de l'extrémité 5' du gène. Ces différents variants alternatifs de CD20 codent tous la même protéine puisque la région codante début au sein de l'exon 3 et est présente de manière identique au sein des 3 transcrits.

La traduction commence au 193^{ème} nucléotide de l'exon 3 et se termine au 215^{ème} nucléotide de l'exon 8 produisant une séquence codante de 894pb.

II.3 La protéine CD20

II.3.1 Structure

La protéine CD20 est ancrée dans la membrane plasmique grâce à 4 domaines transmembranaires. Les extrémités N-terminale (N-ter) et C-terminale (C-ter) sont intracytoplasmiques, et deux boucles extracellulaires ont été mises en évidence : une petite d'environ 6 acides aminés (AA) entre les premier et deuxième segments transmembranaires, et une beaucoup plus importante de 40AA entre les 3^{èmes} et 4^{èmes} segments transmembranaires. À l'intérieur de cette boucle, un pont disulfure relie les AA 163 et 187 créant une structure tridimensionnelle particulière qui s'avèrera être primordiale pour la reconnaissance de CD20 par certains anticorps monoclonaux (AcMo). À noter que l'existence de la plus petite des deux boucles extracellulaire a longtemps été soumise à controverse (Polyak et al., 1998), mais le développement d'anticorps monoclonaux ciblant un épitope conformationnel composé en partie de cette petite boucle semble définitivement confirmer sa présence (Teeling et al., 2006).

II.3.2 Fonctions

Malgré de nombreuses études publiées sur le sujet, la fonction précise de CD20 demeure mal comprise. Sa structure à 4 segments transmembranaires n'est pas sans rappeler celle des canaux ioniques, et plusieurs résultats montrent un rôle dans la signalisation calcique induite par la stimulation du BCR sans pouvoir pour autant conclure sur le rôle exact de CD20 (Li et al., 2004)(Walshe et al., 2008).

II.3.2a Signalisation du BCR et flux calcique

Les lymphocytes B font partie des principaux acteurs de l'immunité adaptative, en répondant aux pathogènes par une prolifération, différenciation, mais surtout la présentation d'antigènes aux lymphocytes T et la production d'anticorps spécifiques des antigènes reconnus. Le développement et la fonction des LB sont principalement déterminés par la signalisation via son récepteur de haute affinité pour les antigènes, le BCR (Fig 8).

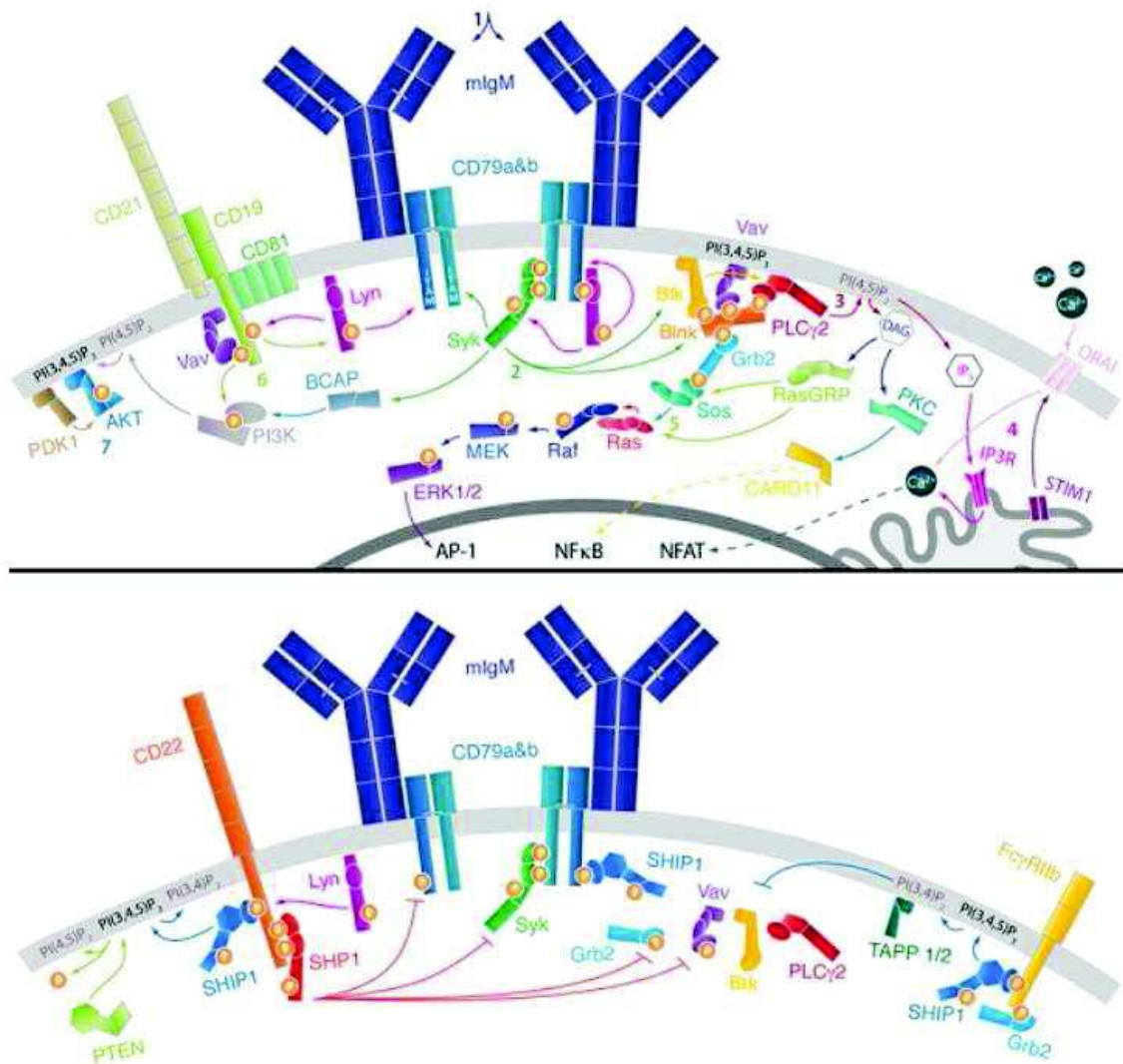


Figure 8: Signalisation du récepteur à l'antigène des lymphocytes B (BCR)

(Haut) La fixation d'un antigène (1) sur le BCR active une cascade de protéines kinases (LYN, SYK) (2) par l'intermédiaire des co-récepteurs CD79a et b, ce qui conduit à la phosphorylation de PLCγ (3) responsable de l'activation de nombreux facteurs de transcription (AP-1, NFκB, NFAT) par les voies de signalisation calciques (4), RAS/RAF/MEK/ERK (5) PI3K/AKT (6)(7).

(Bas) La signalisation du BCR est inhibée par CD22 et le récepteur FcγRIIb qui recrutent les phosphatases SHP1 et SHIP1.

D'après Packar & Cambier, F1000Prime Rep

Le BCR est composé d'une immunoglobine membranaire associée à deux protéines CD79a et CD79b transmembranaires reliées par une liaison disulfure. Cet hétéro-dimère également nommé Igα/Igβ est le module de transduction du signal lors de la reconnaissance d'un antigène par le BCR. Les motifs tyrosine d'activation des immuno-récepteurs (ITAM) situés aux extrémités C-ter sont phosphorylés par des protéines tyrosine kinase telle que LYN. Les résidus ITAM ainsi phosphorylés recrutent la kinase SYK qui

sera elle-même activée par phosphorylation pour activer d'autres kinases du signalosome telle que la phospholipase C_γ (PLC γ). L'activation des voies PI3K/AKT et MEK/ERK entre autres conduisent à la translocation nucléaire de facteurs de transcription régulant la présentation de l'antigène, la production de cytokine, la prolifération ou encore la différenciation des LB (Packard and Cambier, 2013).

LYN phosphoryle également les résidus ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) des protéines inhibitrices de l'activation du BCR que sont CD22 et Fc γ RIIb, ce qui conduit au recrutement des phosphatases SHP1, SHIP1 et PTEN qui par déphosphorylation des protéines SYK et CD79, entre autres, vont permettre la régulation des voies de signalisation en aval du BCR. Cette régulation est primordiale pour le contrôle de l'activation des LB puisque l'absence de ces protéines régulatrices conduit à une production anormale d'auto-anticorps, symptômes du développement d'auto-immunité (Pao et al., 2007) (O'Keefe et al., 1999).

La modulation de la concentration en calcium intracellulaire constitue dans tous les types de cellules l'une des principales voies de régulation de processus cellulaires telles que la prolifération et l'apoptose. Les ions calcium participent à la perméabilisation mitochondriale et au relargage du cytochrome-c et accélèrent la formation de l'apoptosome (Mattson and Chan, 2003).

Lors de la reconnaissance d'un antigène par un LB, la voie de signalisation du BCR est activée et conduit à la libération du calcium contenu dans les organites intracellulaires dont le réticulum endoplasmique. La diminution des stocks intra-cellulaires de calcium provoque une entrée de calcium via des canaux ioniques membranaires. Cet efflux ionique, fréquemment nommé « SOCE » (store-operated calcium entry), passe en grande majorité par des canaux formés par les protéines ORAI1 (Calcium release-activated calcium channel protein 1) et STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1) (Fig 9).

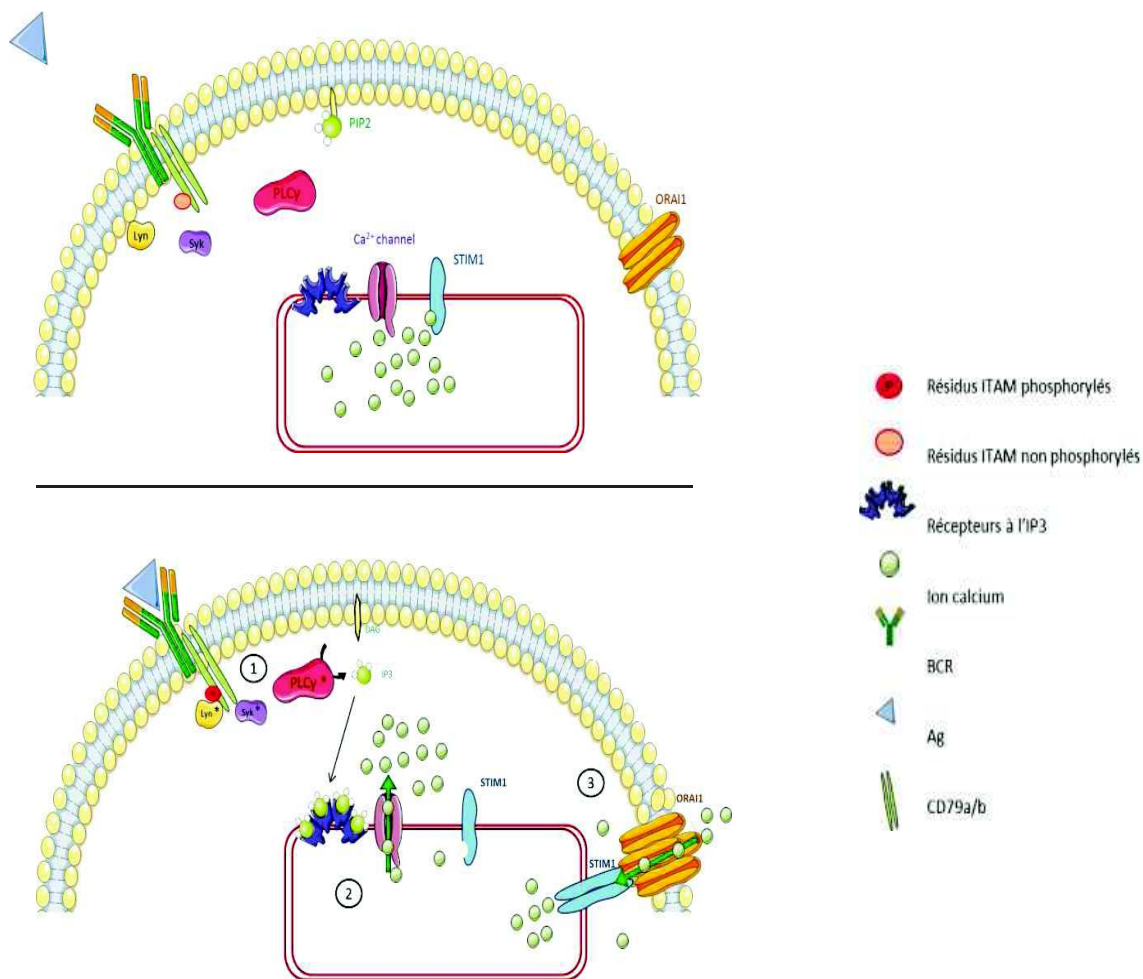


Figure 9: Flux calcique déclenché par l'activation du BCR

(Haut) En absence d'activation du BCR les stocks d'ions calcium des réticulum endoplasmiques sont pleins et le domaine en main EF de STIM1 est occupé par un ion Ca^{2+} .

(Bas) L'activation du BCR active les kinases LYN et SYK qui activent à leur tour la phospholipase-C gamma (PLC γ) (1). Cette dernière hydrolyse du phosphatidylinositol4,5diphosphate (PIP2) en inositol tri-phosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). L'IP3 se fixe sur des récepteurs ancrés dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) ce qui provoque le relargage d'ions calciums (Ca^{2+}) dans le cytoplasme (2). La diminution de la teneur en Ca^{2+} dans le RE est détectée par STIM1 qui s'homodimérise et transloque vers la membrane plasmique pour s'associer aux tétramères d'Orai1 formant un canal calcique transportant les d'ions Ca^{2+} vers le RE pour restaurer les stocks en Ca^{2+} (3).

II.3.2b CD20, BCR et flux calcique

La protéine CD20 a été associée lors de nombreuses études à la signalisation en aval du BCR et particulièrement aux voies de signalisation calcique.

Une association entre CD20 et les chaînes légères d'IgM et Ig μ a été observée au sein des radeaux lipidiques de LB non activés grâce à des expériences d'immunoprécipitation (Polyak et al., 2008). Lors de l'activation du BCR, ce dernier se dissocie de CD20 avant d'être internalisé. La déplétion en cholestérol des

cellules, qui conduit à la dégradation des radeaux lipidiques, n'empêche pas la colocalisation de CD20 et du BCR mais en revanche ralentit leur dissociation suite à l'activation du BCR (Petrie and Deans, 2002).

Une autre preuve en faveur d'un lien étroit entre les protéines CD20 et BCR est la démonstration d'une voie de signalisation commune en aval de ces deux molécules : l'effet des stimulations du BCR et de CD20 est abrogé identiquement par l'inhibition des kinases SYK, PI3K et Sérine/Thréonine Kinases (STK). Les flux calciques déclenchés par les voies de signalisation du BCR et de CD20 sont tous deux inhibés par le récepteur FcγRIIb, récepteur inhibiteur responsable de la régulation négative de l'activation du BCR (Walshe et al., 2008).

En plus d'une association claire avec le complexe du BCR, de nombreuses études sont en faveur d'une implication de CD20 dans la signalisation calcique.

En 1993 Bubien et Tedder ont démontré qu'une expression ectopique de CD20 dans des lignées humaines initialement CD20 négatives augmente la conductance du calcium suite à la déplétion des stocks intracellulaires par la thapsigargin (Bubien et al., 1993). Les mêmes résultats ont été obtenus par l'équipe de Julie Dean qui a également montré que cette entrée de calcium était dépendante de la localisation de CD20 au sein des radeaux lipidiques (Li et al., 2003). Le développement d'un modèle murin pour lequel le gène CD20 est inactivé (*cd20^{-/-}*) révèle, malgré un développement et une maturation normale des LB, une altération du flux transmembranaire de calcium dans les LB *cd20^{-/-}* suite à la stimulation du BCR (Uchida et al., 2004). De plus, une corrélation a été établie entre la génération de flux calcique à l'intérieur de lignées et l'expression du BCR : aucun flux calcique n'est déclenché après stimulation de CD20 dans des lignées ne possédant pas de BCR alors qu'un fort flux est observé chez les mêmes cellules exprimant fortement les protéines du BCR (Walshe et al., 2008).

L'ensemble de ces études semble corroborer l'hypothèse selon laquelle CD20 est une molécule impliquée dans la signalisation calcique en aval du BCR. Malgré la très forte similitude de structure entre le canal calcique ORAI1 et CD20, il semblerait que CD20 ne puisse être un canal calcique à part entière comme l'est ORAI1 en raison d'un manque de spécificité envers le calcium : des AA glutamate au sein des segments transmembranaires d'ORAI1 confèrent une grande affinité du canal pour les ions calcium. En revanche CD20 pourrait être un canal calcique annexe, responsable de la régulation de l'entrée calcique de type SOCE. Par ailleurs, l'absence d'impact majeur provoqué par l'inactivation de CD20 prône un rôle secondaire de cette protéine.

Chapitre 2 : Le Rituximab et autres Anticorps Monoclonaux anti-CD20

I. Hémopathies B

I.1 Lymphomes B

I.1.1 Évènements oncogéniques au cours du développement des LB

I.1.1a Les translocations

Parmi les lymphomes diagnostiqués dans le monde, 95% sont d'origine B pour seulement 5% d'origine T. Cette très grande prévalence s'explique par d'importants facteurs de risques de survenue d'anomalies au niveau de l'ADN au moment de plusieurs processus accompagnant le développement des lymphocytes B.

Environ 15 lymphomes B sont répertoriés par la classification de l'organisation mondiale de la santé basée sur les différences de pathogenèse mais également de traitement de ces diverses formes de lymphome B. Les différents lymphomes sont caractérisés par le stade de développement auquel se trouve le clone malin d'origine et par les propriétés acquises par ce clone (Fig 10).

Une grande majorité des lymphomes se développe à partir de cellules formant les CG (CG) ou issues de ces CG. Les hypermutations somatiques ainsi que la commutation de classe que subissent les centroblastes en forte prolifération augmentent le risque de survie d'un clone malin.

De nombreuses translocations chromosomiques sont impliquées dans l'oncogenèse des lymphomes et concernent le plus souvent les régions codant les chaînes lourdes d'Ig (IgH) et certains oncogènes. Les cassures double brin de l'ADN au moment du réarrangement de la région variable du BCR et de la commutation de classe favorisent la survenue de ces anomalies chromosomiques.

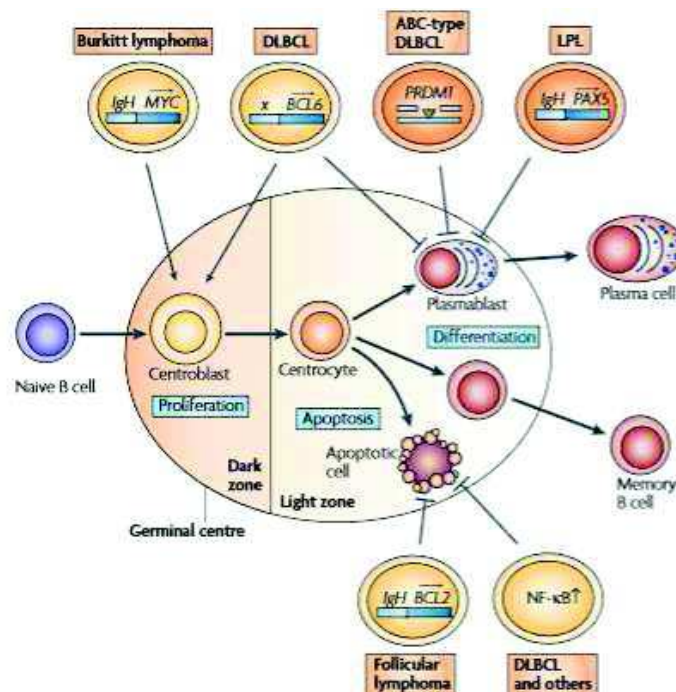


Figure 10: Anomalies génétiques à l'origine de lymphomes B

La suractivation de l'oncogène myc par translocation chromosomique lors de la prolifération des centroblastes est à l'origine du lymphome de Burkitt.

Une dérégulation de l'expression de BCL-6 par les centroblastes est impliquée dans la survenue du lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL). Une inactivation du gène suppresseur de tumeurs PRDM1 (positive-regulatory-domain containing 1) inhibiteur de BCL-6 provoque un blocage de prolifération des plasmoblastes favorisant la survenue de DLBCL de type ABC (activated-B cells). La dérégulation de pax5 suite à une translocation chromosomique est associée aux lymphomes lymphoplasmacytoïdes (LPL).

La surexpression de BCL-2 suite à une translocation chromosomique inhibe l'apoptose des centrocytes ce qui est une caractéristique des lymphomes folliculaires. Une surexpression de NFκB est par ailleurs fréquemment observée dans les cellules tumorales.

D'après Klein & Dalla-Favera, Nat Rev Immunol 2008

Une translocation entre les chromosomes 11 et 14 impliquant le gène *bcl-1* et celui codant la chaîne lourde de l'Ig (*IgH*) est observée dans une grande majorité des cas de **lymphomes à cellules du manteau** (Megendorfer et al., 2013). Cette translocation, qui constitue le premier évènement oncogénique, a lieu au moment du réarrangement VDJ dans la moelle osseuse et provoque une surexpression de la Cycline D1. Les anomalies supplémentaires nécessaires au déclenchement de la tumorigénèse surviennent au niveau de cellules pré-germinales matures naïves LB CD5⁺ localisées dans la périphérie du follicule appelée zone du manteau (Jares and Campo, 2008).

Les même types d'évènements conduisent au développement de **lymphomes folliculaires** : une translocation (14;18) place le gène *bcl-2* sous le contrôle des séquences régulatrices des gènes codant les chaînes lourdes d'Ig ce qui induit une surexpression de BCL-2. 60% des patients atteints de cette pathologie sont porteurs de la translocation qui surviendrait là encore lors du réarrangement des gènes VDJ dans la

moelle osseuse. Cet évènement seul ne suffit pas à l'oncogenèse puisqu'elle est fréquemment observée chez des sujets sains (Roulland et al., 2014) : la prolifération de cellules malignes se déroule dans les follicules secondaires des OLS lors de la survenue de nouvelles anomalies chez un LB des CG déjà porteur d'une translocation (14;18).

Trois autres translocations chromosomiques sont critiques pour le développement du **lymphome de Burkitt**, dont la population monoclonale anormale dérive des LB de la zone « noire » des CG composée de cellules en très forte prolifération (Victora et al., 2012). Les translocations (8;14), (2;8) et (8;22) déplacent le gène codant le facteur de transcription MYC au sein des régions codant les chaînes lourdes ou légères des Ig provoquant son anormale expression. Au cours de la lymphogenèse physiologique *myc* est exprimé uniquement au stade de centrocytes dans la zone claire des CG (Greenough and Dave, 2014). Cet oncogène régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose, la prolifération et le cycle cellulaire tels que *bcl-2*, plusieurs cyclines ou encore les acides ribonucléiques (ARN) ribosomiaux. Sa surexpression suite à une translocation provoque donc de nombreuses anomalies de l'apoptose et de la prolifération, favorisant le développement de clones malins.

Ces mêmes translocations du gène *myc* sont observées, à une fréquence largement inférieure, chez les patients atteints du lymphome à cellules B le plus fréquent : le **lymphome diffus à grandes cellules B** (DLBCL). Le clone malin d'origine est issu du CG, à un stade pouvant être plus ou moins avancé de la différenciation.

Plusieurs autres translocations sont à l'origine de la survenue de cette pathologie, dont une impliquant le gène *bcl-6* qui lors d'une translocation impliquant le chromosome 3 se trouve constitutivement activé. En conditions physiologiques l'expression de *bcl-6* conditionne la formation des follicules secondaires. Ce facteur de transcription réprime également la transcription de gènes impliqués dans le blocage du cycle cellulaire ou l'induction d'apoptose en cas de dommages de l'ADN et de ce fait, permet le déroulement des mutations somatiques et de la commutation de classe au sein des LB des CG. En cas d'activation dérégulée comme c'est le cas suite à la translocation, l'émergence d'un clone tumoral est favorisée puis la survie est accentuée et les remaniements génétiques non corrigés sont facilités.

La translocation (14;18) observée lors de lymphomes folliculaires est également observée dans 30% des DLBCL.

La survenue d'anomalies au moment de la commutation de classe des LB des CG peut conduire à la formation de **myélomes multiples**, caractérisés par l'accumulation dans la moelle osseuse de plasmocytes

tumoraux. Dans 20% des cas, une dérégulation de la Cycline D1 en raison d'une translocation (11;14) est observée et une surexpression d'oncogènes tel que *fgfr3* suite à la translocation (4;14) l'est dans 10% des cas.

I.1.1b Les mutations

Lors de l'introduction de mutations somatiques au niveau des CG, des mutations peuvent être anormalement incorporées dans certains oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs. Cela conduit à une altération de fonction pouvant favoriser le développement de lymphomes.

La sérine/thréonine kinase ATM est recrutée lors d'une cassure double brin de l'ADN et initie le processus de contrôle de dommages à l'ADN en activant plusieurs protéines chargées de l'arrêt du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN et de l'induction d'apoptose dont p53 le facteur de transcription « gardien du génome ».

Des mutations du gène *atm* souvent associées à une délétion de la région 11q22-23 sont fréquemment observées dans les lymphomes à cellules du manteau (Camacho et al., 2002). Ces mutations sont le plus souvent non-sens, faux-sens ou décalantes, conduisant à une perte de fonction de la protéine.

Dans 20% des lymphomes B issus des CG, une mutation inactivant CD95 est observée, protégeant les lymphocytes B de l'apoptose induite par les cellules exprimant FAS-L. La mutation de ce gène suppresseur de tumeur est observée dans les **DLBCL**, les **myélomes multiples** et un peu plus rarement dans le **lymphome de Hodgkin** qui est une pathologie maligne provoquée par la prolifération anormale d'un clone apoptotique après la maturation d'affinité des LB.

I.1.2 Transformation virale par le virus Epstein Barr (EBV)

Le virus EBV est un herpès virus largement répandu puisque 90 à 95% des adultes sont porteurs d'anticorps spécifiques de ce virus. Le virus se transmet principalement par voie salivaire. La primo-infection intervient le plus souvent dans l'enfance et est quasi systématiquement asymptomatique. Mais lorsqu'elle intervient à l'âge adulte, elle déclenche dans la moitié des cas une mononucléose infectieuse causée par la très forte réponse du système immunitaire en réponse à l'infection. Le virus infecte dans un premier temps l'épithélium oropharyngé puis les LB à l'intérieur desquels il pénètre en se fixant sur le récepteur CD21.

Plusieurs groupes de gènes viraux sont séquentiellement exprimés au cours des différentes étapes de l'infection et du cycle de vie du virus. Les B infectés expriment dans un premier temps un grand nombre

de gènes viraux permettant une activation et une prolifération du LB. Ce programme génétique est appelé « latence III » et permet l'expression de protéines nucléaires activatrices de voies de signalisation cellulaires telles que les EBNA et LMP mais également des miRNA (BART) et des ARN non codants (EBER) (Fig 11) (Saha and Robertson, 2011).

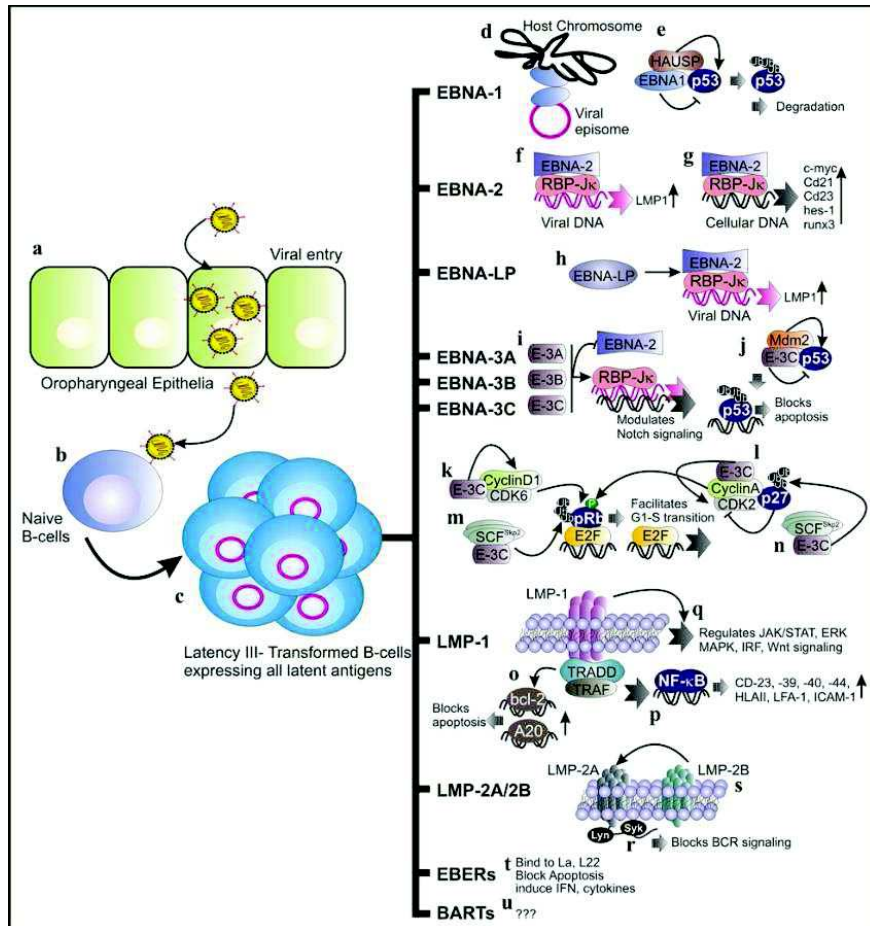


Figure 11: Implication des antigènes de latence dans la transformation maligne associée à l'EBV

Après une infection des cellules épithéliales oropharyngées (a), l'EBV infecte les LB (b) qui expriment alors l'intégralité des antigènes de latence (latence III) (c). EBNA-1 permet la réplication virale et la ségrégation des épisomes viraux lors de la réplication cellulaire (d) et induit la dégradation de p53 bloquant ainsi l'apoptose (e). EBNA-2 augmente l'expression d'oncogènes viraux (LMP-1) (f) et cellulaires (C-MYC) (g). EBNA-LP augmente l'expression de LMP-1 (h) et les EBNA-3 modulent la voie Notch (i), bloquent l'apoptose (j) et facilitent la transition G1-S du cycle cellulaire (k,l,m,n). LMP-1 bloque l'apoptose (o) et active la transcription de nombreux gènes en régulant les voies de signalisation JAK/STAT, MAPK, Wnt (p) ou encore NFkB (q). LMP-2A et-2B bloquent la signalisation du BCR (r,s). Les EBERs bloquent l'apoptose en se liant à La et L22 (t). Le rôle des miRNA BARTs dans la survenue de lymphomes EBV induits n'est pas encore démontré (u).

D'après Saha & Robertson, Clin Can Res 2011.

Une proportion de ces LB infectés pénètre dans les CG et réprime l'expression de plusieurs gènes viraux afin de n'exprimer plus que EBNA-1, LMP-1 et LMP-2 (Vockerodt et al., 2015). Ce nouveau programme de

latence (latence II) permet une survie des LB dans les CG et une différenciation en LB-MEM. Ces LB-MEM porteurs de l'EBV répriment encore le nombre de gènes exprimés (latence 0) afin d'échapper aux LT_{CD8} et NK spécifiques des antigènes EBV, permettant ainsi la persistance virale.

L'importance du contrôle de l'infection virale par les LT est mise en lumière chez les patients immuno-déprimés. En effet chez les individus sains, les LT_{CD8} éliminent les LB transformés par l'EBV principalement en reconnaissant les antigènes EBNA-3. L'altération de cette réponse T provoque une perte de contrôle de l'infection et conduit à une expansion incontrôlée des LB. Ce phénomène s'illustre lors du développement de tumeurs B EBV+ après greffes suite auxquelles les patients sont traités par immunosuppresseurs (IS) nécessaires à la prise de greffe. Ces lympho-proliférations sont cependant le plus souvent facilement contrôlées par arrêt des IS et très sensibles aux stratégies thérapeutiques de transfert adoptif de LT.

Lors de la réplication des LB, l'expression d'EBNA-1 est nécessaire à la répartition des épisomes viraux répliqués lors de la division cellulaire. Cet état dit « de latence I » est celui observé dans la plupart des cas de lymphomes B EBV+. En effet le virus EBV est largement associé à la survenue de lymphomes principalement en raison de la survie et la prolifération accrue des LB induites par l'expression de protéines virales. Ces avantages prolifératifs favorisent l'émergence et la croissance d'un clone porteur d'une anomalie génétique responsable de la survenue de tumeur.

Le plus connu des lymphomes associés à l'EBV est la forme sporadique du Lymphome de Burkitt particulièrement présente en Afrique sub-saharienne et associée au paludisme (Kaminski et al., 1993). L'infection par le paludisme affaiblirait le système immunitaire qui ne serait alors plus à même de contrôler l'infection virale favorisant ainsi la prolifération de cellules EBV+ potentiellement porteuses de translocation (8:14) caractéristique du Lymphome de Burkitt. La translocation c-myc accélère la prolifération des LB mais induit également l'apoptose : le progéniteur de Lymphome de Burkitt doit donc acquérir un second évènement pour contrer cet effet délétère à sa survie. L'expression d'EBNA-1 et son action anti-apoptotique et pro-proliférative permettraient cette survie (Kennedy et al., 2003).

Le DLBCL est parfois associé à une infection par EBV ce qui est par ailleurs facteur de mauvais pronostic (Lu et al., 2015). Ces lymphomes regroupent des pathologies hétérogènes, classées en 2 sous-types : les « germinal center B-cell » et les « activated B-cell ». Les DLBCL EBV+ seraient majoritairement de type ABC et le plus souvent associés à une immunosuppression notamment chez les patients porteurs du VIH. Les programmes de latence II et III y sont fréquemment exprimés (Vockerodt et al., 2015).

Une proportion de lymphomes de Hodgkin est porteuse du virus. Ce lymphome est issu d'un clone ne possédant pas de BCR fonctionnel et ayant échappé à l'apoptose au niveau des CG. LMP-1 peut contribuer à la survie de ces cellules par l'activation de NF- κ B, JAK/STAT et PI3K/AKT (Vockerodt et al., 2015).

I.2 La LLC

I.2.1 Les anomalies génétiques marqueurs et facteurs pronostiques de la maladie

La LLC est une hémopathie causée par la prolifération d'un clone lymphocytaire B issu d'un LB mature. Ce clone malin est le plus fréquemment porteur des marqueurs CD5, CD19, CD20, CD23 et CD79b.

L'évolution de la pathologie est chronique, débutant par une phase fréquemment asymptomatique qui évolue à vitesse très variable. La classification de Binet basée principalement sur l'importance de la lymphocytose, l'envahissement ganglionnaire et l'altération des autres composants sanguins, détermine largement la prise en charge thérapeutique des patients : les stades B et C nécessitent une prise en charge thérapeutique rapide alors que les stades A ne présentent, dans un premier temps, aucune indication de traitement. Devant l'hétérogénéité de l'évolution de cette pathologie, il semble primordial d'identifier des facteurs pronostiques permettant de prédire l'évolution de la maladie.

Plusieurs anomalies contribuent au diagnostic mais revêtent également un intérêt pronostique : les délétions 17p et 11q sont par exemple associées à une rapide progression en raison d'une inactivation des gènes suppresseurs de tumeur *p53* et *atm* respectivement alors que la délétion 13q est associée à une meilleure survie (Puiggros et al., 2014).

Si l'expression de CD38 et ZAP-70 sont de mauvais pronostics en raison d'une prolifération et d'une signalisation via le BCR accrues, la présence d'une mutation de la chaîne lourde de l'Ig (IgHV) est associée à une pathologie moins évolutive.

Grâce à l'émergence du séquençage haut débit, de nouvelles mutations sont dorénavant recherchées : *sf3b1*, *notch1* ou encore *birc3* sont fréquemment mutés et associés à des survies limitées. L'utilisation de ces récents marqueurs permet une stratification des LLC et une identification des patients ayant de forts risques de voir leur pathologie évoluer rapidement et de ne pas répondre aux traitements conventionnels (Landau and Wu, 2013) (Mori et al., 2012).

I.2.2 Les traitements de la LLC

Bien que cette maladie soit à l'heure actuelle difficilement curable, les progrès effectués dans le développement et l'association des molécules de chimio-immunothérapie ont permis de considérablement accroître la survie des malades. Le chlorambucil a été durant longtemps le traitement de première ligne de référence mais cet agent alkylant n'ayant jamais montré de taux de réponses complètes satisfaisant, il est de moins en moins utilisé en monothérapie (Hallek, 2015). Parmi les analogues des purines fréquemment utilisées, la fludarabine demeure le plus efficace (Hallek, 2015), et la Bendamustine est depuis 2008 utilisée chez les patients pour lesquels une polychimiothérapie comportant de la fludarabine n'est pas indiquée. L'addition à ces chimiothérapies des anticorps monoclonaux (AcMo) anti-CD20 Rituximab (RTX) (Hallek et al., 2010) mais surtout Ofatumumab (Wierda et al., 2010) a largement amélioré la survie des patients.

L'anti-CD52 (Alemtuzumab) est quant à lui largement utilisé chez les patients âgés chez qui la fludarabine est déconseillée et améliore la survie principalement en cas de résistance aux traitements de première ligne et de patients à haut risque.

Le développement d'un clone malin à partir d'un LB mature serait largement dépendant de la présence de cellules stromales dans son environnement, ainsi que de l'engagement du BCR. Ce dernier permet le maintien du clone malin dans le ganglion et permet sa prolifération au contact de cellules stromales (Burger, 2011). Dans ce contexte, l'utilisation d'inhibiteur de kinases empêchant l'activation du BCR pourrait largement contribuer à l'élimination du clone malin.

Le développement de ces inhibiteurs est actuellement en plein essor et leur utilisation en traitement de la LLC est très prometteuse. L'Idélalisib est un inhibiteur de PI3K qui en association au RTX a permis lors d'une étude de phase III incluant des patients en rechute d'obtenir 77% de réponses globales à 4 mois contre 15% pour le RTX administré seul. Cet inhibiteur est particulièrement efficace chez les patients de mauvais pronostiques, IgHV non muté ou porteurs de la del17p soulignant là encore l'importance de l'utilisation de marqueurs biologiques lors du choix de la stratégie thérapeutique (Furman et al., 2014). L'Ibrutinib est un inhibiteur de BTK qui a montré de meilleurs taux de survie globale que l'OFA ou que l'association RTX/Bendamustine (Morabito et al., 2015).

I.3 Les maladies auto-immunes (MAI)

Le **pemphigus vulgaire** est une MAI cutanéomuqueuse bulleuse caractérisée par la formation de bulles et vésicules dans les épithéliums. Les lésions cutanées bulleuses résultent de la dégradation des protéines responsables de la jonction entre kératinocytes par des auto-anticorps, majoritairement dirigés contre les protéines desmoglérine (DSG).

Les anti-DSG ne sont cependant pas les seuls responsables du déclenchement de la pathologie : il semblerait que des anticorps dirigés contre les récepteurs à l'acétylcholine des kératinocytes participent également à la dissociation des jonctions entre kératinocytes (Kalantari-Dehaghi et al., 2013).

Cette MAI est considérée comme médiée par les LT car la production d'auto-anticorps anti-DSG3 est conditionnée par la présence de LT CD4^+ principalement Th2. Ces LT spécifiques de DSG-3 activent la sécrétion d'IgG4 et d'IgE anti-DSG3 en activant les LB (Eming et al., 2014). Dans 95% des cas de pemphigus, les LT autoréactifs sont HLA-DRB1*0402 et DQB1*0503 (Ruocco et al., 2013). En l'absence de lymphocytes, la survenue de la pathologie semble bloquée.

La **polyarthrite rhumatoïde** est une maladie causée par une réaction inflammatoire exagérée de la membrane synoviale des articulations. La mise en place de l'auto-immunité débute par la reconnaissance d'épitopes issus de protéines citrullinées par des LT via le HLA-DRB1 (Sakkas et al.). L'inflammation chronique est caractérisée par la sécrétion d'auto-anticorps dirigés contre des protéines citrullinées, la production d'anticorps anti-IgG appelés facteur rhumatoïde ainsi qu'une importante quantité de cytokines pro-inflammatoires dont TNF- α , IL-6 et IL-1. Cette inflammation accrue conduit à la dégradation des structures osseuses et à la déformation des articulations.

Les causes exactes de la survenue de la maladie sont encore mal connues, mais le tabagisme et certaines infections ont été identifiés comme des facteurs favorisant la production d'auto-Ac préalable au déclenchement de la maladie (Combes, 2008)

Le lupus érythémateux systémique, ici plus simplement appelé lupus, est une inflammation auto-immune chronique associée à des dommages tissulaires causés par la formation de complexes immuns et la production d'auto-anticorps. Ces auto-anticorps, produits par les LB auto-réactifs, sont dirigés contre des protéines nucléaires et affectent le tissu conjonctif de nombreux organes tels que la peau, les articulations, les poumons, les reins et le système nerveux. De nombreuses cytokines sont associées à la mise en place de la pathologie dont l'IL-6, l'IL-10, l'IL-17, l'interféron (IFN) et BAFF (Vincent et al., 2014). APRIL, un ligand de la famille du TNF a été corrélé avec les niveaux d'expression d'IL-17 et d'IFN- γ , mais une surexpression d'APRIL n'est pas directement corrélée au développement de lupus (Vincent et al., 2014). Les lymphocytes B semblent avoir un rôle central dans la pathogenèse de cette MAI au-delà de la simple sécrétion d'anticorps : un modèle murin utilisant des LB incapables de générer des anticorps ne suffit pas à prévenir l'apparition de la maladie, alors que l'absence de LB limite le développement du lupus (Chan et al., 1999).

La très large prédominance féminine (90% des cas) suppose une influence hormonale sans que cela ait été formellement établi.

Le purpura thrombotique idiopathique est une pathologie auto-immune causée par la présence d'auto-anticorps dirigés contre les plaquettes sanguines. La protéine ADAMTS-13 est détruite par des IgG qui peuvent être produites suite à une mauvaise élimination des LB auto-réactifs au cours du développement ou suite à une perte de tolérance consécutive à l'activation de plasmocytes. Cette perte de tolérance conduit à une activation des autres cellules immunitaires telles que les LT et les NK et l'ensemble du système immunitaire contribue à la destruction des plaquettes et des mégacaryocytes.

ADAMTS-13 intervient dans la coagulation sanguine et son absence conduit à des lésions hémorragiques.

II. Les AcMo anti-CD20

II.1 Historique de l'avènement du RTX

L'étude des AcMo s'accélère dans les années 1950 lorsque Henry Kunkel découvre lors de ses travaux à l'institut Rockefeller que le sang de patients atteints de myélome présente d'importantes quantités d'un seul type d'Ac, alors que les plasmocytes sains sécrètent une plus faible quantité d'Ac, mais avec une grande diversité.

Le premier AcMo thérapeutique approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) en 1986 est développé pour cibler et éliminer les lymphocytes T (LT). Cet anticorps nommé Murumomab-CD3 ou Orthoclone OKT3 (Janssen-Cilag) est dirigé contre la chaîne epsilon de la protéine CD3. Sa fixation entraîne la mort des LT par apoptose. Il sera durant plusieurs années le principal immunosuppresseur utilisé dans le rejet de greffes de rein et marque le début de l'utilisation d'AcMo thérapeutiques chez l'humain.

Le clonage des régions variables d'un AcMo murin (2B8) dans un plasmide d'expression contenant les chaînes lourdes d'une IgG1 humaine (Reff et al., 1994) permet pour la première fois la production d'un anticorps chimérique. Cet anti-CD20, nommé C2B8, permet l'activation des effecteurs humains via la fixation de la portion constante de l'IgG malgré la synthèse de cet anticorps chez la souris (Reff et al., 1994).

Un premier essai clinique de phase I incluant 15 patients atteints de LNH en rechute après traitement par chimiothérapie permet de tester le C2B8 : parmi les 9 patients traités à plus de 100mg/m², un seul n'a pas répondu alors que 2 réponses partielles et 4 réponses mineures ont été observées (Maloney et al., 1994).

La même équipe réalise un essai clinique de phase II au cours duquel 37 patients atteints de LNH en rechute sont traités par 375mg/m² de C2B8, dorénavant appelé rituximab (RTX). Le taux de réponse est de 46%, dont 3 réponses complètes et 14 réponses partielles (Maloney et al., 1997). Le même type d'étude menée sur 166 patients atteints de lymphomes folliculaires ou de bas grade montre 48% de répondeurs (McLaughlin et al., 1998).

La FDA autorise l'utilisation du RTX pour le traitement de LNH de bas grade ou folliculaire, en rechute ou réfractaire aux autres traitements, le 26 Novembre 1997. L'agence européenne de médecine et la haute autorité de santé feront de même en 1998.

Coiffier et ses collègues testent en 1998, lors d'un essai clinique de phase II, l'efficacité du RTX dans le traitement de DLBCL et de lymphomes du manteau. Huit injections à 375mg/m² de même qu'une 1 injection de 375mg/m² suivie par 7 injections à 500mg/m² conduisent identiquement à 37% de réponse globale dans les DLBCL et 33% dans les lymphomes du manteau, un taux de réponse plus faible que dans d'autres pathologies qui révéla alors la nécessité de combiner le RTX à des chimiothérapies existantes (Coiffier et al., 1998).

Cela est réalisé dès 1999 par le Dr Czuczman, qui traite 40 LNH de bas grade ou folliculaire par 6 injections de RTX à 375mg/m² associées à une chimiothérapie de type CHOP (Cyclophosphamide, Hydrodaunorubicine, Oncovin et Prednisone). Cette association RTX + CHOP (R-CHOP) permet d'obtenir 95% de réponses globales, révolutionnant alors la prise en charge de ces pathologies (Czuczman et al., 1999).

La comparaison à plus grande envergure de l'efficacité de traitement de LNH par une chimiothérapie seule (CHOP) ou additionnée de RTX (R-CHOP) menée sur 399 patients montrent un meilleur taux de réponse complète (76% vs 63%), une meilleure survie à 2 ans (76% vs 57%), et un moindre taux de progression pendant le traitement (9% vs 22%) démontrant de manière formelle l'utilité du RTX (Coiffier et al., 2002).

En 2010, une large étude de phase III est menée sur 817 patients pour évaluer l'efficacité du RTX en traitement de première ligne des LLC. Les taux de réponse complète obtenus en associant le RTX à la chimiothérapie (fludarabine/cyclophosphamide) (44%) sont bien inférieurs à ceux obtenus dans le traitement de lymphomes mais demeurent largement supérieurs à ceux obtenus par traitement chimiothérapie seule (22%) justifiant là encore l'importance de l'usage du RTX (Hallek et al., 2010).

Le RTX est par la suite devenu le traitement de référence des pathologies B malignes, et est dorénavant approuvé pour le traitement de nombreuses pathologies, seul ou en combinaison à des chimiothérapies.

II.2 Mécanismes d'action du RTX

Les AcMo thérapeutiques actuellement développés agissent par plusieurs mécanismes d'efficacité variable selon les Ac. Une meilleure compréhension des modes d'action du RTX est nécessaire pour une amélioration et une adaptation des traitements des diverses pathologies impliquant les LB.

Deux grands types de mécanismes sont à distinguer : ceux liés à la fixation directe de la portion variable de l'anticorps sur la cible et ceux résultant de la reconnaissance du fragment Fc par d'autres cellules de l'immunité.

II.2.1 Les FcR

Une grande partie des propriétés effectrices des anticorps passe par la fixation du fragment Fc sur un récepteur spécifique exprimé par de nombreuses cellules de l'immunité innée et adaptative mais également des tissus non immunitaires. Ces FcR sont des acteurs prépondérants du système immunitaire puisqu'ils permettent aux cellules de l'immunité innée d'exercer une réponse ciblée contre un antigène malgré l'absence de récepteurs spécifiques. Une importante diversité de ces récepteurs existe selon la classe d'anticorps reconnue, les types cellulaires qui les expriment et la signalisation cellulaire induite par la fixation. Les FcγR, FcαR et FcεR reconnaissent respectivement les anticorps de types IgG, IgA et IgE.

Les FcR sont composés d'un polypeptide de fixation à la portion Fc de l'anticorps et d'un domaine intracytoplasmique permettant la transmission de signaux intracellulaires. Certains récepteurs sont activateurs de voies de signalisation grâce à leurs motifs ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif, d'autres sont inhibiteurs et répriment l'activation de la signalisation grâce à leurs domaines ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif).

L'activation d'une voie de signalisation dépend de l'engagement de plusieurs FcR à la surface d'une cellule par fixation de plusieurs anticorps sur un même pathogène et l'activation des propriétés effectrices d'une cellule dépend de la balance d'activation de ces FcR activateurs et inhibiteurs.

II.2.2 La phagocytose et la neutralisation de pathogènes

De nombreux pathogènes infectent les cellules de l'organisme en se liant à des protéines de surface afin d'être internalisé par endocytose.

La fixation d'AcMo sur ces protéines empêche leur fixation aux récepteurs cellulaires et ainsi limite l'entrée des pathogènes dans les cellules cibles : on parle alors de neutralisation.

En plus d'empêcher l'infection, certains AcMo dont le RTX participent directement à l'élimination des pathogènes en agissant en opsonines : les IgG fixés à l'antigène sont reconnus par les FcγR de cellules phagocytaires chargés de leur élimination par phagocytose.

La phagocytose est un puissant processus biologique consistant en l'ingestion par des cellules de larges particules (pathogènes, cellules tumorales, corps apoptotiques) reconnues par un récepteur cellulaire tels que les récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires caractéristiques des pathogènes (PRR) ou les FcR. Dès l'engagement de plusieurs FcγR, ces derniers se réorganisent par diffusion latérale afin de conduire à une invagination de la membrane qui constitue le début de formation de la « coupe phagocytaire » (Freeman and Grinstein, 2014). Une vésicule complète se forme autour du pathogène à endocyter par polymérisation des filaments d'actine. Les vésicules sont ensuite transportées à travers le cytoplasme et fusionnées avec des lysosomes afin d'en dégrader le contenu.

La fixation du RTX sur des cellules CD20⁺ engendre une élimination partielle de cette population par phagocytose médiée par des macrophages *in vitro* (Manches et al., 2003). En revanche, le RTX ne semble pas suffisamment efficace pour induire la phagocytose en présence de sang total alors qu'il l'est en présence d'une fraction de polynucléaires purifiés (Golay et al., 2013). De récents résultats montrent une inhibition de la phagocytose par l'Ibrutinib : le traitement de macrophages par cet inhibiteur de BTK limite de manière transitoire la prise en charge de cellules de LLC préalablement ciblées par le RTX (Borge et al., 2015). L'association du RTX et de l'Ibrutinib dans le traitement de patients atteints de LLC réfractaires montrant 95% de réponses et une survie sans progression de 78% à 18 mois laissent cependant présager d'un faible impact de cette réduction de la phagocytose dans la déplétion des LB (Burger et al., 2014).

II.2.3 L'ADCC

Les NK et les neutrophiles sont capables de fixer les complexes antigènes/anticorps grâce à leurs FcR (Albanesi et al., 2013).

Les cellules NK et neutrophiles possèdent des capacités cytolytiques conférées par la présence dans leur cytoplasme de granules cytotoxiques (Wagner et al., 2008). Ces granules sont des organites intracellulaires hybrides, capables en plus de leurs fonctions lysosomales de stocker des protéines cytotoxiques avant dégranulation (Thiery et al., 2010)(Basile et al., 2010).

Parmi les composantes de ces granules lytiques, on trouve les molécules pro-apoptotiques FASL et TRAIL (Trail associated death domain protein) déclencheurs d'apoptose, des peptides cathelicidines et défensines au rôle antimicrobien par activation de NK ou macrophages (Krzewski and Coligan, 2012) mais

surtout les protéines perforines et granzymes. La perforine est capable de perforer la membrane cellulaire du pathogène, et la granzyme est une sérine protéase déclenchant l'apoptose après avoir pénétré à l'intérieur de la cible grâce aux brèches formées par la perforine (Fig 12).

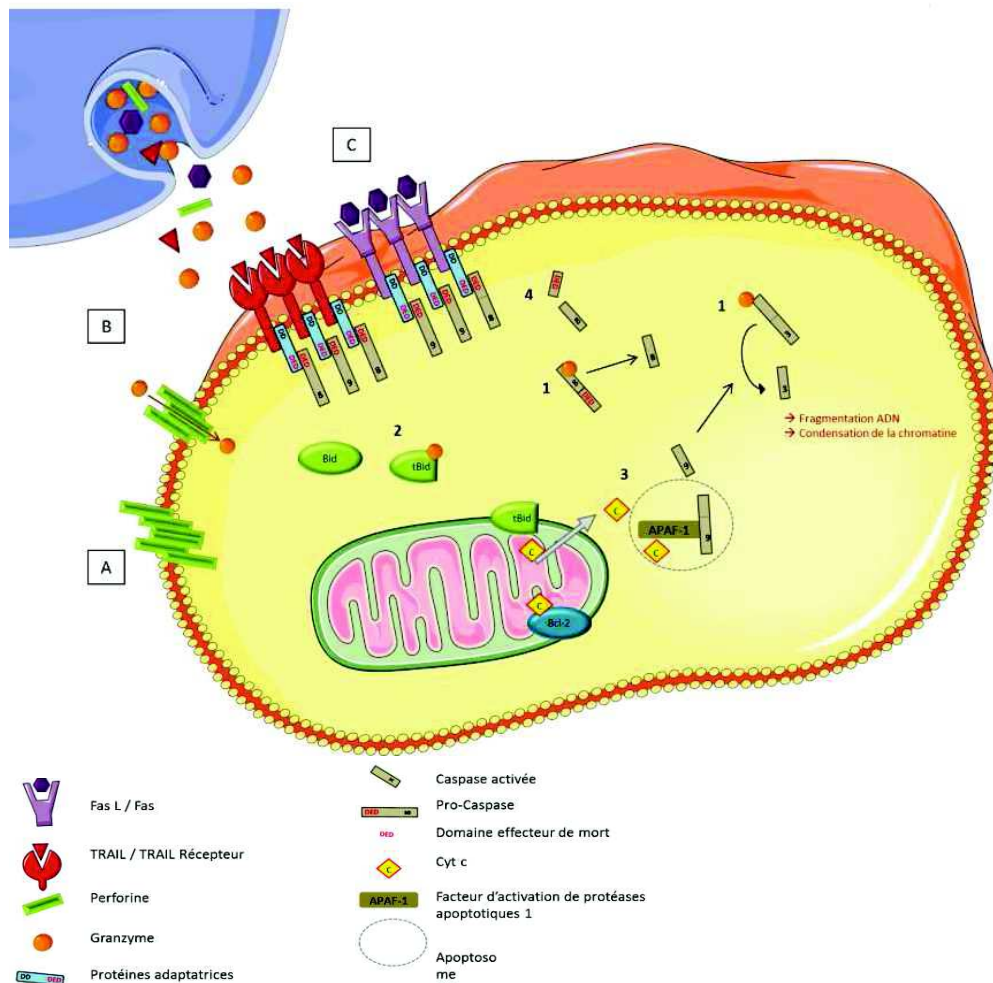


Figure 12: Conséquences de la dégranulation des cellules Natural Killer (NK)

Les granules cytotoxiques contiennent des enzymes perforines et granzymes ainsi que des ligands des récepteurs de mort FAS et TRAIL. (A) A forte concentration, la polymérisation de perforine crée des pores dans la membrane plasmique et induit une lyse cellulaire. (B) Les granzymes activent l'apoptose soit en pénétrant dans la cellule cible par des canaux formés par les perforines ancrées dans la membrane plasmique, soit par endocytose. Les granzymes clivent directement les caspases-8 et -3 (1) et la protéine pro-apoptotique BID (2). L'activation de BID induit le relargage du cytochrome-c et la formation de l'apoptosome (3) activateur de la caspase-3. (C) La fixation de FASL et TRAIL sur les récepteurs de mort FAS et TRAIL-R active l'apoptose par activation de la caspase-8 (4)

Plusieurs études ont montré une déplétion des LB par ADCC après fixation du RTX. *In vitro* 45% des LB de prélèvements de patients atteints de LLC sont déplétés par une ADCC médiée par le RTX. Une stimulation des NK par IL-2 augmente l'efficacité de déplétion du RTX aussi bien face à des cellules primaires qu'à des lignées cellulaires, démontrant là encore la possibilité de recrutement de ces effecteurs par le RTX (Golay et al., 2003).

Si l'ADCC ne semble pas toujours majoritaire lors du traitement de patients par RTX (Harjunpää et al., 2000), des modifications du fragment Fc pourraient permettre d'accroître ce mécanisme et par conséquent améliorer les traitements.

II.2.4 L'activation du complément

Le système du complément est un ensemble de protéines sériques qui coopère avec l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les acteurs de ce puissant système sont activés par clivage en cascade : chaque clivage libère un fragment possédant une activité enzymatique de type protéase qui clive à son tour son substrat spécifique. Le complément participe à l'élimination directe de pathogènes et fait à ce titre partie intégrante de l'immunité innée. Il permet également de stimuler les réponses effectrices des LT, LB et lymphocytes mémoires ce qui lui confère un rôle d'interface entre les immunités innée et adaptative.

Trois voies initiatrices du complément existent et toutes convergent vers l'activation du complexe enzymatique C3 convertase (Fig 13). La voie d'activation dite « classique » du complément débute par la formation d'un complexe antigène/anticorps. La voie des lectines permet l'activation du complément suite à la reconnaissance de pathogènes microbiens par des lectines telles que la mannose binding lectin et permet l'activation de la même C3 convertase que la voie classique. La voie alterne est activée par l'hydrolyse spontanée d'une molécule C3.

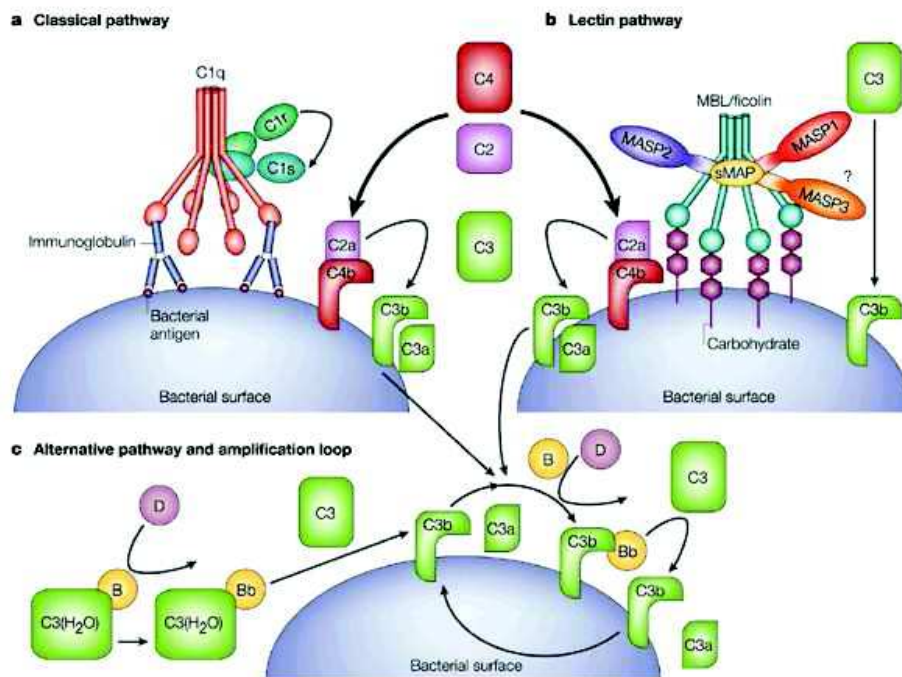


Figure 13: Les différentes voies d'activation du complément

(a) La voie classique est déclenchée par le recrutement de C1q par une Ig ce qui déclenche une cascade protéolytique activant la C3 convertase.

(b) La voie des lectines est déclenchée par la liaison de la protéine de liaison au mannose (MBP) à la surface du pathogène qui recrute 2 sérines protéases qui clivent les composés C4 et C2 du complément et conduit à l'activation de la C3 convertase.

(c) La voie alterne est activée par l'hydrolyse spontanée de C3 qui recrute les facteurs B et D, qui après clivage forment une C3 convertase alterne. Les molécules C3b clivées par les 2 autres voies du complément peuvent former une C3 convertase alterne et ainsi amplifier la cascade du complément.

D'après Fujita et al, Nat Rev Immunol May 2002

La C3 convertase permet la production de C3b par clivage de C3, et C3b est indispensable à l'activation de la C5 convertase.

Lors du clivage du composant C5 par la C5 convertase, le plus grand fragment produit, C5b, se fixe à la surface membranaire, marquant le début de formation d'un complexe d'attaque membranaire (CAM). C6, C7, C8 puis C9 sont alors recrutés à la membrane. Plusieurs molécules C9 vont alors polymériser et s'insérer dans la membrane afin d'y former une brèche puis un CAM provoquant la perte d'intégrité membranaire (Fig 14) (Vlaicu et al., 2013). La mort cellulaire ainsi induite semble être apoptotique ou nécrotique selon la quantité de CAM qui endommage la membrane.

Les différents fragments produits par hydrolyse des composants du complément participent à l'élimination des pathogènes par plusieurs voies.

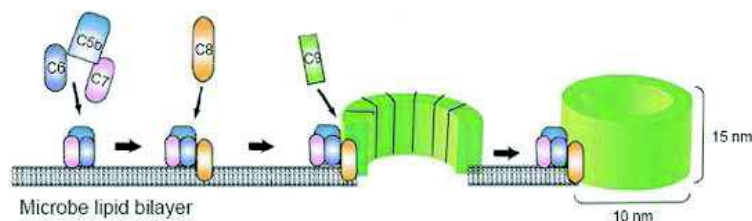


Figure 14: Formation du Complexe d'attaque membranaire (CAM) par le système du complément

Un changement de conformation des protéines C6, C7 et C8 permet leur ancrage dans la membrane plasmique. Les molécules C9 recrutées ensuite s'insèrent dans la membrane et polymérisent pour former une brèche d'environ 10nm appelée CAM.

Modifié de Dunkelberger et al, Cell Research 2010

Les fragments C3b, en plus d'activer la C5 convertase, agissent en opsonine et recouvrent les pathogènes en se fixant en grand nombre à leur surface membranaire (van Strijp et al., 2014). Les pathogènes sont ainsi détectés et dégradés par les cellules phagocytaires porteuses du récepteur CR1 spécifique de C3b.

Les petits fragments libérés lors des clivages des divers composants du complément sont des anaphylatoxines qui vont recruter les cellules immunitaires impliquées dans l'inflammation.

Enfin, le complément joue un rôle primordial lors de la contraction de la réponse immunitaire puisqu'il permet l'élimination des leucocytes apoptotiques (Benoit et al., 2012) et des complexes immuns persistants en fin de réponse immunitaire par opsonisation, empêchant le développement de pathologies auto-immunes.

II.2.5 La mort cellulaire directe (transduction de signaux)

L'induction de mort cellulaire indépendante des récepteurs Fc a été observée par l'équipe de Benjamin Bonavida grâce à l'utilisation de molécules de RTX F(ab)'2 dépourvues de fragment Fc ou de molécules dépourvues de la portion CH2 nécessaire à la reconnaissance par les FcR. L'utilisation de ces molécules révèle qu'en absence de portion Fc reconnaissable par les FcR, la lyse des cellules cibles par les mécanismes d'ADCC et de CDC est inexistante mais l'induction d'apoptose et l'inhibition de prolifération sont similaires à celles induites par le RTX (Vega et al., 2009). Ces expériences valident l'induction de signalisation directe lors de la fixation du RTX sur la molécule CD20 modulant à la fois les voies de survie du lymphocyte B dérégulées dans les cancers mais également les voies d'apoptose.

II.2.5a L'induction d'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée, déclenchée par les cellules de manière physiologique au cours de l'embryogenèse, du renouvellement cellulaire ou de l'élimination de cellules porteuses d'anomalies cellulaires. L'apoptose est caractérisée par de nombreux changements cellulaires dont la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire ou encore la réduction du volume cellulaire. Le déclenchement de l'apoptose conduit à l'activation de cystéine aspartyl-specific protéases, autrement nommées caspases, qui une fois activées vont cliver de nombreux substrats assurant le maintien de l'intégrité cellulaire.

Deux voies de signalisation dépendantes des caspases mènent à l'induction d'apoptose : la voie extrinsèque médiée par les récepteurs de mort et la voie intrinsèque mitochondriale médiée par la formation de l'apoptosome.

La voie extrinsèque est déclenchée par la reconnaissance de signaux extracellulaires par des récepteurs de la famille du TNF (Fig 15). Ces récepteurs vont activer le clivage de caspases par l'intermédiaire de protéines adaptatrices. L'hydrolyse de plusieurs caspases mène à l'activation de caspases effectrices (principalement la caspase-3) responsable entre autres de la fragmentation de l'ADN, la modification de protéines membranaires, la condensation du cytoplasme ainsi que la formation de corps apoptotiques qui seront pris en charge et éliminés par les phagocytes sans relargage de signaux inflammatoires.

La voie intrinsèque, autrement appelée voie mitochondriale, est déclenchée par des stimuli intracellulaires tels que des anomalies de l'ADN ou des privations en facteurs de croissance. Ces signaux provoquent le changement de conformation de protéines de la famille BCL-2 telles que BAX et BAK qui transloquent au niveau de la membrane mitochondriale et s'homodimérisent pour introduire des pores dans cette membrane (Fig 15). Cette perméabilisation membranaire provoque le relargage de composés mitochondriaux dont le cytochrome-c. Ce dernier, une fois associé à la protéine adaptatrice des caspases APAF-1, permet l'oligomérisation d'APAF-1 en heptamères et le recrutement de la procaspase-9, formant ainsi l'apoptosome (Lopez and Tait, 2015).

La formation de ce complexe permet l'auto-activation de la caspase-9 qui ensuite clive et active les caspases-3 et 7 effectrices de la mort cellulaire.

Des interactions entre les deux voies existent : la caspase-8 peut par exemple cliver la protéine BID, activatrice de la voie mitochondriale (Yin et al., 1999)(Scaffidi, 1998) (Fig 16).

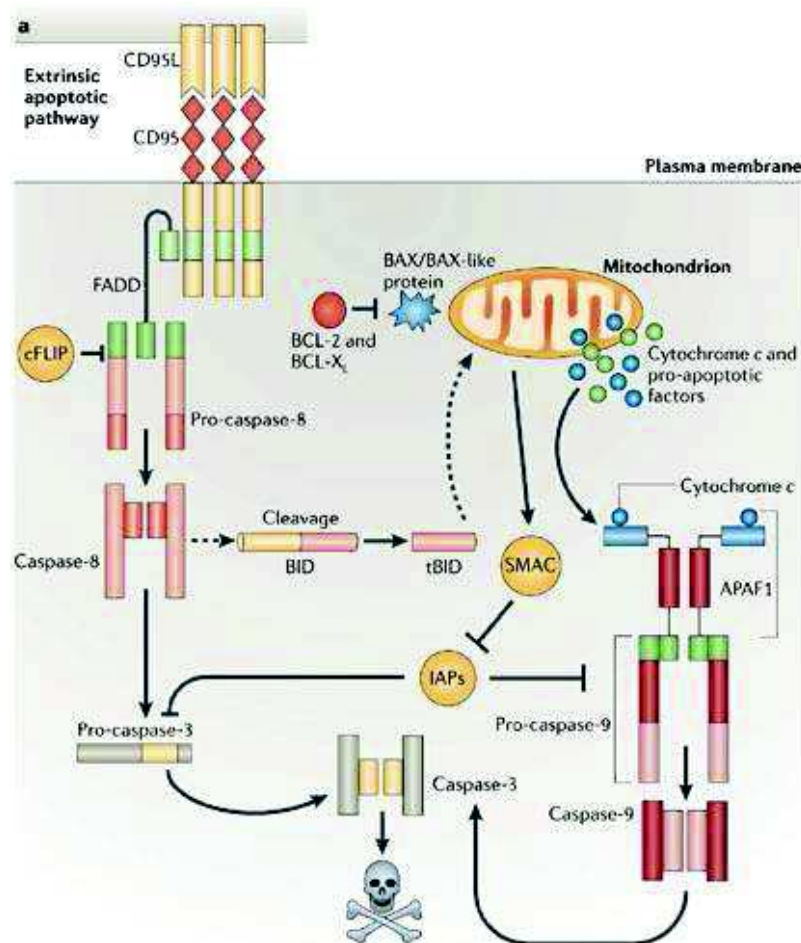


Figure 15: Les voies d'apoptoses extrinsèque et mitochondriale (ou intrinsèque)

La voie extrinsèque est déclenchée par l'activation de récepteurs de mort tels que CD95 (FAS) et aboutit à l'activation de la caspase-3 via la caspase-8. La voie intrinsèque ou mitochondriale est déclenchée par le relargage du cytochrome-c de la mitochondrie où il est séquestré grâce aux protéines anti-apoptotiques BCL-2 ou BCL-xL. Le cytochrome-c active l'apoptosome et active la caspase-3 via la caspase-9.

Une communication entre les voies extrinsèques et intrinsèques est possible par clivage de BID par la caspase-8.

c-FLIP (cellular FLICE like inhibitory protein) et IAPs (protéines inhibitrices d'apoptose) bloquent l'apoptose en inhibant respectivement la caspase-8 et les caspases-3 et -9

D'après Hotchkiss & Nicholson, Nat Rev Immunol 2006

L'induction d'apoptose par le RTX a été observée par de nombreuses équipes par traitement de lignées B en absence de toute cellule effectrice et de molécule du complément. Ces expériences ont montré une induction d'apoptose caspase dépendante, faisant intervenir les SRC kinases LYN, FYN et LCK ainsi que les voies de signalisation calcique (Shan et al., 2000).

De nombreuses études ont investigué les voies de signalisation mises en jeu par la fixation d'AcMo anti-CD20 sur les LB. L'étude de cellules B de patients atteints de LLC avant et après traitement par RTX montre un clivage des protéines caspase-9, caspase-3 et de PARP 4h après l'injection du traitement (Byrd et al., 2002). Ces marqueurs d'apoptose corrélient par ailleurs avec une meilleure déplétion des LB. *In vitro*, la mort cellulaire induite par le RTX est dans certaines études associée à la voie extrinsèque (Stel et al., 2007), et dans d'autres semble résulter de la voie mitochondriale.

L'inhibition de FAS, le blocage des voies du BCR, l'inhibition des caspases ou encore la surexpression de l'anti-apoptotique BCL-2 n'empêchent jamais complètement l'apoptose induite par le RTX (van der Kolk et al., 2002). Ces résultats suggèrent que plusieurs voies distinctes peuvent déclencher l'apoptose médiée par le RTX.

De nombreuses observations vont également dans le sens de l'existence d'une mort cellulaire caspase indépendante. Par exemple, le traitement par RTX de cellules leucémiques de patients atteints de LLC induit une mort cellulaire indépendante du complément ou de l'ADCC, mais également indépendante des caspases puisque les substrats des caspases effectrices PARP et PKC- γ ne sont pas activés (Stanglmaier et al., 2004). Les mécanismes de ce phénomène demeurent cependant mal connus, mais une des hypothèses avancées serait l'induction de macro-autophagie, plus couramment appelé autophagie. Ce processus consiste en la dégradation de constituants cellulaires grâce à la formation d'autophagolysosome à l'intérieur duquel les enzymes lysosomales dégradent le contenu (Codogno, 2004). Les marqueurs d'autophagie tels que l'expression de LC3II (protéine associée aux microtubules nécessaires à la formation de l'autophagosome) sont augmentés suite au traitement de certaines lignées de lymphome de Burkitt par RTX et la mort cellulaire directe induite est diminuée lors du blocage de l'autophagie (Turzanski et al., 2009). Cependant, la distinction entre apoptose et autophagie est délicate puisqu'ils sont interconnectés et se régulent mutuellement par l'activation de protéines impliquées dans les deux processus telles que p62 et BECLIN-1 (Gump and Thorburn, 2011)(Maiuri et al., 2007) (Fig 16).

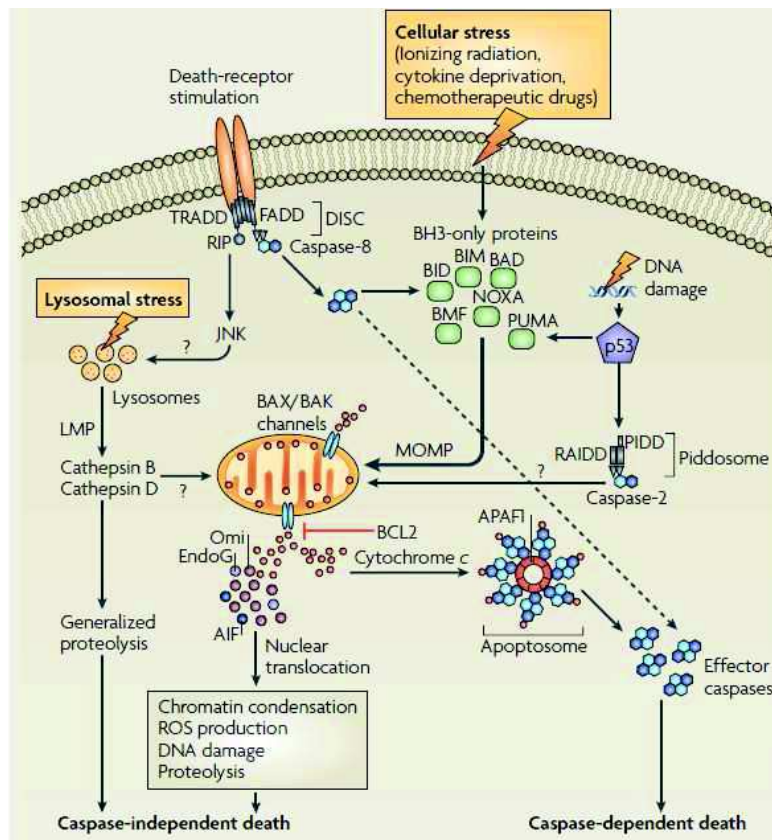


Figure 16: Mort cellulaire apoptotique et non-apoptotique

La stimulation de récepteurs de mort et les stress cellulaires activent la mort cellulaire par apoptose utilisant les voies intrinsèque et extrinsèque. Un stress lysosomal active une mort cellulaire indépendante des caspases. L'activation de la kinase JNK (c-jun N-ter kinase) par la voie extrinsèque pourrait activer les lysosomes et conduire en parallèle à une apoptose indépendante des caspases. A l'inverse, les cathepsines activées par la voie lysosomale pourraient activer la voie mitochondriale.

D'après Maiuri et al, Nat Rev Mol Cell Biol 2007

II.2.5b Le blocage des voies de survie

En plus de provoquer une mort cellulaire directe par l'activation des voies apoptotiques, la fixation du RTX sur CD20 module les voies de survies cellulaires, fréquemment suractivées lors de la survenue d'hémopathies. Il permet ainsi une meilleure efficacité des agents de chimiothérapie ou radiothérapie auxquels il est fréquemment couplé en clinique.

Le contrôle de la survie ou l'induction de mort sont entre autres régulés par le ratio des protéines pro- et anti-apoptotiques, qui s'homo et s'hétérodimérisent pour se neutraliser.

Les protéines anti-apoptotiques, dont les plus connues sont BCL-2, BCL- xL et MCL-1, sont localisées au niveau de la membrane mitochondriale où elles empêchent le relargage du cytochrome-c et par conséquent la formation de l'apoptosome (Lopez and Tait, 2015).

L'action des protéines pro-apoptotiques passent par l'inhibition de ces anti-apoptotiques.

Une suractivation de BCL-2 est fréquemment observée dans les leucémies et lymphomes : le traitement par RTX conduit à la diminution d'expression de BCL-2 et donc à la restauration de la sensibilisation des cellules à la chimiothérapie en partie par une inhibition de la voie de signalisation IL-10/STAT-3/BCL-2 (Vega et al., 2004). Le traitement par RTX induit également une diminution d'expression de BCL- xL qui restaure la sensibilité à l'apoptose des lignées traitées (Jazirehi et al., 2003). Cette modulation passe par la régulation des voies de survie NFkB et ERK/MEK, ayant en commun d'être inhibées par une protéine inhibitrice de RAF (RKIP) augmentée lors du traitement par RTX (Bonavida, 2006) (Jazirehi et al., 2004).

L'activité de BCL- xL est également modulée par la voie de signalisation de la kinase AKT par l'intermédiaire de la protéine pro-apoptotique BAD : l'activation de PI3K/Akt induit la phosphorylation de BAD qui en conséquence libère BCL- xL. L'étude des modulations de cette voie lors du traitement par RTX a démontré une diminution de la SRC kinase LYN, associée à une diminution de phosphorylation d'AKT, de PDK1 et de BAD, diminuant de ce fait les molécules BCL- xL libres, rendant une nouvelle fois les cellules plus sensibles à l'apoptose (Suzuki et al., 2000).

II.3 Développement de nouveaux AcMo

Malgré un remarquable taux de réponses initiales, environ 30% des patients traités pour des LNH par des thérapies contenant du RTX seraient non-répondeurs ou résistants (Lim and Levy, 2014)(Stolz and Schuler, 2009). Des disparités existent entre pathologies, les lymphomes indolents étant notamment moins sensibles que les lymphomes agressifs.

De nombreuses études ont été menées *in vitro* et *in vivo* pour déterminer les causes de ces non-réponses et résistances afin d'améliorer les stratégies thérapeutiques.

II.3.1 Les mécanismes de résistance au RTX

II.3.1a La modulation d'expression de CD20

Une des principales causes de résistance est la diminution d'expression des cibles de l'Ac : en effet, plusieurs études ont corrélé l'efficacité de déplétion des LB par le RTX à la densité de protéines CD20 membranaires. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine d'une diminution voire une perte d'expression de CD20.

- Epigénétique

Le traitement par RTX démontre une meilleure efficacité dans le traitement de LNH que dans celui de LLC. Cela semble s'expliquer par la faible expression de CD20 (Almasri et al., 1992) à la surface des LB leucémiques qui serait la cause d'une hyperméthylation du promoteur *pu.1* de CD20. Le traitement par un agent déméthylant de LB de patients atteints de LNH CD20 négatives après traitement par RTX a par ailleurs montré une restauration de l'expression de CD20, associée à une augmentation des réponses au RTX (Hiraga et al., 2009). La même observation a été faite par Ushmorov en traitant des lignées cellulaires de maladies de Hodgkin, caractérisées par une très faible expression des gènes du linéage B dont *cd19* et *cd20* (Ushmorov et al., 2006). Ces observations démontrent l'existence d'une régulation épigénétique de *cd20* pouvant participer à l'échappement des cellules tumorales lors du traitement par RTX.

La mise en place de lignées résistantes au RTX *in vitro* par traitement de lignées CD20⁺ par des doses sub-optimales de RTX montre une diminution d'expression de CD20 à la surface cellulaire au fur et à mesure de l'acquisition de résistance (Tsai et al., 2012). Cette diminution d'expression est associée à une plus faible activité du promoteur et à une anomalie des voies de transport des protéines. L'ajout d'IL-4 restaure l'activité du promoteur, l'expression de CD20 et la sensibilité au RTX.

- Élimination des complexes CD20-RTX de la surface membranaire

D'autres mécanismes peuvent également contribuer à la résistance au RTX non pas en diminuant l'expression de la cible, mais en éliminant les complexes CD20-RTX dès leur formation à la surface des cellules. C'est le cas du mécanisme de shaving qui consiste en l'élimination d'une Ig fixée à la surface d'une cellule sans entraîner d'altération de cette dernière (Pedersen et al., 2011). Ce phénomène peut être couplé à celui de la trogocytose, qui correspond à un échange de matériel membranaire entre deux cellules en contact dont seraient capables bon nombre de cellules.

Ainsi, lors de la fixation d'Ig sur un récepteur FcR d'une cellule effectrice, une synapse immunologique se met en place et un échange de matériel membranaire peut avoir lieu entre la cellule cible et la cellule effectrice: la coculture de cellules Raji opsonisées par du RTX et des cellules monocytaires THP-1 durant 45min suffit à observer par microscopie confocale la présence de RTX à la membrane des THP-1, associé à une portion membranaire originaire des Raji (Beum et al., 2008).

Un autre mécanisme bien connu est l'internalisation par la cellule cible des complexes Ig-antigène. Les premières études sur le sujet concernant les AcMo anti-CD20 montraient cependant une très faible internalisation des anti-CD20, contrairement à ce qui était observé pour des anti-CD19 ou anti-IgM (Press

et al., 1994). Mais très rapidement il a été constaté chez des patients atteints de LLC une diminution voire une perte d'expression de CD20 après traitement par RTX, causée par une internalisation du complexe CD20-RTX (Jilani et al., 2003). Ce phénomène est indépendant de la présence de cellules effectrices et est principalement médiée par l'activation des FcγRIIb présents sur la cellule cible (Lim et al., 2011).

II.3.1b L'altération du recrutement des effecteurs

Un recrutement altéré des effecteurs pourrait également largement diminuer l'efficacité du RTX. En ce sens, l'expression des inhibiteurs du complément a été étudiée chez des patients traités pour des lymphomes folliculaires par RTX sans qu'aucune corrélation n'ait pu être établie entre l'expression de ces inhibiteurs et la réponse au traitement (Weng and Levy, 2001). Le même type d'étude menée en 2010 après traitement par R-CHOP de LNH CD20+ semble suggérer à l'inverse une plus importante expression de CD46 et CD59 chez les non répondeurs en comparaison aux patients en réponse complète (Dzietczenia et al., 2010). Les mêmes résultats ont été rapportés par Golay et Introna : CD55, et dans une moindre mesure CD59, seraient en partie associés à la résistance au RTX de lignées cellulaires B (Golay et al., 2000).

Parmi les autres effecteurs recrutés par le RTX via son fragment Fc, les cellules NK et les phagocytes sont primordiaux pour l'efficacité d'action du RTX. Comme décrit précédemment, ces effecteurs sont recrutés au contact de la cellule cible via la reconnaissance de fragment Fc du RTX par les FcγR.

Un polymorphisme du gène FcγRIIIa a été mis en évidence au niveau de l'AA 158 qui est directement impliqué dans la reconnaissance de la portion Fc des IgG. Cet AA est dans 57% des cas un résidu phénylalanine, et dans 43% des cas un résidu valine. Ce polymorphisme conduit à des profils hétérozygotes FcγRIIIA-158F/V (45%), ou homozygotes FcγRIIIA-158F/F (35%) et FcγRIIIA-158V/V (20%). Cette observation est corrélée à une meilleure réponse au traitement par RTX des patients FcγRIIIA-158V/V que des patients porteurs d'un résidu phénylalanine, vraisemblablement en raison d'une ADCC plus efficace (Cartron et al., 2002).

II.3.1c Les modulations des voies de signalisation

Au-delà des modulations d'expression de CD20 et de reconnaissance par le RTX, des altérations des modulations des voies de signalisation normalement provoquées par la fixation de l'anticorps sont fréquemment observées *in vitro*. Les lignées résistantes au RTX montrent une suractivation des voies de prolifération et de survie telles que NFκB, JNK, PI3K/Akt ou p38-MAPK. Les patients non répondeurs au RTX en première ligne du traitement de LNH montrent une dérégulation de la voie PI3K/AKT et une

surexpression de l'anti apoptotique BCL-2 (Hasselblom et al., 2010). De plus, une expression accrue des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 est observée en parallèle d'une diminution d'expression des protéines pro-apoptotiques BAX et BAK.

Des défauts de reconnaissance de l'anticorps par les cellules effectrices de l'immunité sont également à l'origine de non-réponse au RTX puisque malgré les troubles de l'expression de CD20 vu précédemment, 95% des patients atteints de LNH sont CD20⁺ au moment du traitement et seulement 70% répondent. Une altération de la conformation de CD20 pourrait empêcher la reconnaissance par le RTX notamment suite à la modification des radeaux lipidiques.

II.3.2 Le développement de nouveaux AcMo

Afin d'améliorer les traitements, de nouveaux AcMo anti-CD20 ont été développés dans le but d'éliminer plus efficacement les LB.

L'équipe de Martin Glennie et la société Genmab ont en 2004 développé un anti-CD20 IgG1 entièrement humain présentant *in vitro* une CDC accrue par rapport au RTX en raison d'un recrutement plus efficace de la molécule C1q (Pawluczko et al., 2009).

Cet AcMo, nommé **Ofatumumab (OFA)** et commercialisé sous le nom d'ARZERRA par GlaxoSmithKline, a obtenu en 2014 l'approbation de la FDA pour le traitement de LLC réfractaires aux traitements conventionnels que sont le chlorambucil, la fludarabine, la bendamustine et l'alemtuzumab. Il est également autorisé en traitement de première ligne associé au chlorambucil.

Cette approbation a été motivée par une étude menée par Wierda montrant 58% de réponses chez des patients résistants à la fludarabine ou à l'alemtuzumab (Wierda et al., 2010).

L'utilisation de l'OFA en première ligne a été par la suite justifiée puisque son association au chlorambucil augmente de 71% la survie sans progression en comparaison au chlorambucil seul lors du traitement de LLC non préalablement traitées.

L'efficacité de l'OFA en traitement de LLC, moins sensibles au RTX en raison d'une faible expression de CD20 (Hallek et al., 2010), peut s'expliquer par une différence d'épitope avec le RTX : ce dernier se fixe sur la large boucle extracellulaire de CD20 alors que l'OFA cible un épitope conformationnel composé d'AA de la petite boucle extracellulaire et de la large boucle (Teeling et al., 2006). Cela conférerait à l'OFA une affinité plus importante et une dissociation plus lente que celles du RTX lui permettant d'agir en présence de 6 fois moins de molécules CD20 à la surface cellulaire (Castillo and Perez, 2010). Cette caractéristique alliée à la meilleure activation du C1q explique également l'efficacité de l'OFA pour lyser des cellules

résistantes au RTX ou exprimant une importante expression des inhibiteurs du complément CD55 et CD59 (Teeling et al., 2004) (Shimada et al., 2014).

D'autres AcMo anti-CD20 ont été développés dans le but d'améliorer l'affinité pour le CD20. Le **Veltuzumab** (Immunomedics) est un anticorps type I humanisé présentant les mêmes régions hypervariables (appelées CDR) que le RTX à l'exception d'un acide aspartique à la place de l'asparagine en position 101 du CDR3. Cette modification confère au Veltuzumab une meilleure affinité, une dissociation plus lente et une CDC plus importante que le RTX (Goldenberg et al., 2009). Un essai de phase I/II a été mené sur des patients atteints de LNH en rechute ou réfractaires et a permis d'obtenir 43%, 44% et 83% de réponses pour le traitement de DLBCL, lymphomes folliculaires, et lymphomes de la zone marginale respectivement (Cang et al., 2012). Cet anticorps a été également largement testé dans les pathologies auto-immunes telles que la thrombopénie auto-immune et a obtenu en 2014 le statut de « médicament orphelin » pour le traitement du pemphigus vulgaire en raison d'une même efficacité que le RTX pour traiter cette pathologie, mais à un coût plus faible (Ellebrecht et al., 2014).

L'**Ocrelizumab** (Genentech/Biogen) est également un anticorps humanisé pour lequel quelques AA des CDR ont été modifiés par rapport au RTX et qui montre une ADCC accrue en raison d'une meilleure affinité pour le FcγRIIIa. Son utilisation dans le traitement de LF en rechute ou réfractaires après un traitement par RTX a permis d'obtenir 38% de réponses. Tout comme le Veltuzumab, l'Ocrelizumab a été testé pour le traitement de pemphigus et de lupus mais les deux essais cliniques de phase III entamés ont été stoppés en raison de l'important risque de développement d'infections (Emery et al., 2014)(Mysler et al., 2013). Des résultats encourageants pour le traitement de sclérose multiple ont été obtenus dans un essai de phase II, et un essai de phase III est actuellement en cours (Kappos et al., 2011).

Il est démontré qu'une ADCC efficace dépend en partie de l'interaction entre la portion Fc de l'anticorps et le FcγRIII exprimé par les NK. La composition en oligosaccharides liés au domaine CH2 et principalement la quantité de résidus fucose modulent l'affinité de cette interaction Fc-FcγRIII (Niwa et al., 2005). Un anti-CD20 IgG1 chimérique a été sélectionné par le LFB en raison de sa faible teneur en fucose permettant une haute affinité de cet anticorps pour le FcγRIII. Cet AcMo, nommé **LFB-R603** ou Ublituximab (LFB), induit une mort cellulaire directe similaire à celle du RTX mais une ADCC bien supérieure : alors que 10µg/ml de RTX lysent 30% de cellules Raji en présence de NK, la même concentration de LFB-R603 en lyse 70%. Une seule étude publiée compare *in vivo* l'efficacité du RTX et du R603. Il s'agit d'un modèle murin de lymphomes intra-cérébraux et intra-oculaires : le R603 induit une plus importante déplétion des cellules tumorales et permet la survie des souris contrairement au RTX (Abdelwahed et al., 2013).

L'**Ocaratuzumab** (Mentrik Biotech) et le **PRO131921** (Genetech) sont tous deux des IgG1 humanisés anti-CD20 à la portion Fc modifiée pour accroître son affinité pour le FcγRIIIa. Un essai clinique de phase II a testé cet AcMo en traitement de lymphomes folliculaires en rechute après un premier traitement par RTX. Le taux de réponse globale fut de 38% selon des données présentées au congrès annuel de la société américaine de cancérologie et d'oncologie en 2012 mais qui ne furent pas publiées par la suite. Le PRO131921 n'a été testé qu'en phase 1 dans le traitement de LLC et LNH en rechute ou réfractaires après traitement par analogue des purines ou par RTX respectivement (Casulo et al., 2014).

Tous ces AcMo sont qualifiés de type I en raison de leur capacité à relocaliser CD20 au sein des radeaux lipidiques après fixation. Cette relocalisation est nécessaire notamment au recrutement des composants C1q et donc à l'induction de la CDC, mais également à la mise en place de plateforme de signalisation intracellulaire induisant une apoptose classique (Mollinedo and Gajate, 2015).

Les AcMo qui n'induisent pas cette relocalisation sont qualifiés de type II. Ils n'induisent que très peu de CDC. En revanche, ils provoquent une agrégation homotypique des cellules déclenchant une mort cellulaire caspase indépendante. Le développement d'un autre AcMo anti-CD20 modifié par glyco-ingénierie a permis de mieux comprendre les différences entre AcMo types I et II. Le **GA101** (ou Obinutuzumab) est un anticorps humanisé ciblant CD20 développé par la société Roche démontrant une plus grande efficacité pour le traitement de LLC en association au chlorambucil que le RTX (Gagez and Cartron, 2014). *In vitro*, cet anticorps déplete également plus efficacement des xénogreffes de lignées tumorales humaines de lymphome folliculaire et son effet n'est, contrairement au RTX, pas aboli par l'inhibition du complément (Dalle et al., 2011). Cette déplétion passe essentiellement par l'ADCC et une mort cellulaire directe qui semble indépendante des caspases (Dalle et al., 2011).

Une étude de phase III est actuellement en cours pour comparer l'efficacité du RTX et du GA101 dans le traitement de patient atteints de LNH indolent (étude GALLIUM menée par le groupe Roche) (Gagez and Cartron, 2014).

De tous les AcMo anti-CD20 de deuxième et troisième générations développés pour améliorer le traitement des pathologies impliquant les lymphocytes B, l'OFA et le GA101 semblent les plus prometteurs.

Chapitre 3 : L'épissage alternatif

I. L'épissage constitutif et alternatif

I.1 L'épissage

L'épissage est un processus biologique participant à la maturation des ARNm au même titre que l'addition d'une queue poly(A) en 3' et d'une coiffe en 5'. La queue poly(A) est synthétisée par ajout de nucléotides adénosine (A) par la poly(A)polymérase en 3' du pré-ARNm et la coiffe 5' est créée par l'ajout d'une guanosine méthylée. La maturation des ARNm permet leur protection contre la dégradation et leur export du noyau vers le cytoplasme (Bentley, 2014). Ces étapes sont également indispensables à l'initiation de la traduction : la queue poly(A) est un site de fixation pour la poly(A)binding protein (PABP) et la coiffe en 5' est le site de fixation du facteur d'initiation de la traduction EIF4. L'interaction entre la PABP et EIF4 est nécessaire au recrutement du ribosome et donc à l'initiation de la traduction.

Avant que la traduction n'ait lieu, les séquences introniques non codantes doivent être éliminées du pré-ARNm afin d'accoler les exons contenant la séquence codante. L'excision des introns est faite au cours de la réaction d'épissage.

L'épissage est catalysé par un ensemble complexe de protéines et de petits ARN : le spliceosome. Cet ensemble protéique agit en reconnaissant des séquences nucléotidiques consensus du pré-ARNm permettant l'excision très précise des introns et la mise bout à bout des exons tout aussi précisément. Quatre éléments sont nécessaires à l'excision d'un intron : un site donneur 5' à la jonction exon/intron en amont de l'intron, un site accepteur 3' à la jonction intron/exon en aval de l'intron ainsi qu'un site de branchement à l'intérieur de l'intron environ 15 à 50 nucléotides en amont du SD. Enfin, un site poly-pyrimidine est localisé entre le site de branchement et le site accepteur 3'. Ces sites sont des séquences consensus conservées reconnues par le spliceosome pour catalyser l'excision de l'intron (Fig 17). Les séquences les plus hautement conservées sont les di-nucléotides GT et AG aux extrémités des introns. Le site de branchement est suivi d'une zone poly-pyrimidine importante pour la reconnaissance du site de branchement comme nous le verrons plus loin.

L'élimination de l'intron est possible grâce à deux réactions de trans-estérification remodelant les liaisons phosphodiester du pré-ARNm (Fig 17). Dans un premier temps, l'extrémité 2' OH du ribose de l'adénosine au cœur du site de branchement attaque le phosphate du résidu guanine à l'extrémité de l'intron à exciser au niveau du site donneur 5'. La création d'une nouvelle liaison entre le résidu adénosine du site de branchement et le guanine du SD libère l'exon en amont : le 3'-OH de l'exon en amont ainsi libéré attaque à son tour le phosphate du résidu guanine à l'extrémité de l'intron au niveau de la jonction entre l'intron et l'exon aval. Les deux exons se trouvent ainsi ligaturés et l'intron est éliminé sous forme d'une structure « en lasso » puisqu'une liaison a été créée entre le A du site de branchement et le G du SD.

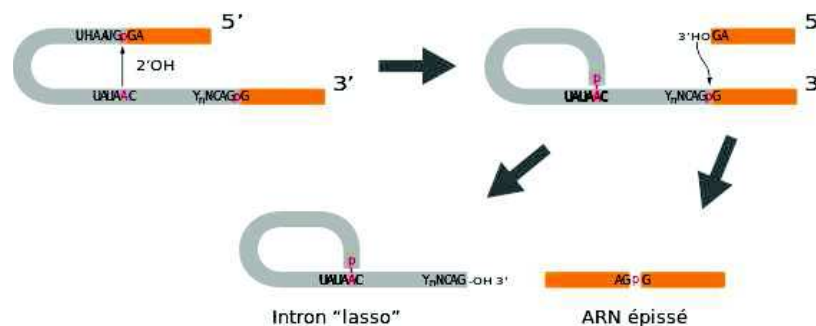


Figure 17: Deux réactions de trans-estérification permettent l'excision d'un intron

L'attaque par l'adénosine du site de branchement du dernier nucléotide 5' de l'intron libère le groupement 3'-OH du dernier nucléotide de l'exon amont. Ce 3'-OH attaque à son tour le dernier nucléotide 3' de l'intron ce qui conduit à l'élimination de l'intron et à la jonction des exons.

L'épissage, comme le reste de la maturation, est un procédé co-transcriptionnel : dès qu'un site donneur est transcrit, plusieurs protéines impliquées dans l'épissage sont transportées et transférées vers le pré-ARNm par l'ARN polymérase II. Dès que les sites accepteurs et de branchement sont synthétisés, l'épissage débute.

L'épissage est dit constitutif lorsqu'un exon est toujours inclus dans le transcrit mature, et alternatif lorsqu'il ne l'est pas systématiquement.

1.2 L'épissage alternatif

Chez les eucaryotes, les ARNs peuvent être épissés de diverses manières conduisant à la synthèse de plusieurs ARNm à partir d'un seul gène. Ces variants alternatifs résultent en partie du fait que tous les exons ne sont pas forcément retenus dans l'ARNm (on parle de saut d'exon lorsqu'ils ne le sont pas) et les introns pas systématiquement excisés (on parle de rétention d'intron).

Par ailleurs, les sites d'épissages ne sont pas uniquement localisés au niveau des jonctions intron/exon : de nombreux autres existent à l'intérieur d'introns et d'exons et sont alors qualifiés de cryptiques par opposition aux sites canoniques des extrémités d'introns. Si un site d'épissage cryptique intronique est utilisé, alors une portion non codante de l'ADN est retenue dans l'ARNm (on peut parler d'exon étendu). En revanche, si un site cryptique exonique est utilisé, une partie de cet exon sera excisée lors de l'épissage (Fig 18).

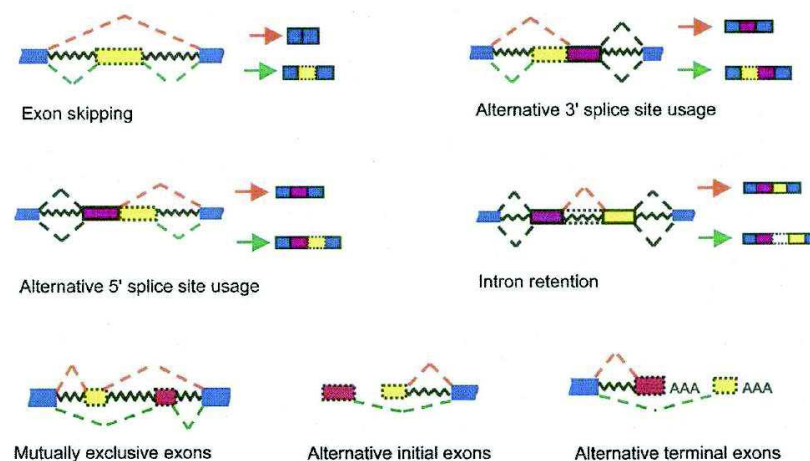


Figure 18: Les différents types d'épissage alternatif

Les exons constitutifs (bleus) sont systématiquement inclus dans l'ARNm mature contrairement aux exons alternatifs (rouge et jaune). Une portion d'intron (ligne brisée) peut être retenue complètement ou en partie.

D'après Wang et al, RNA 2008

Deux exons peuvent également être mutuellement exclusifs, c'est-à-dire que seul l'un des deux sera incorporé dans l'ARNm. Cela implique une régulation suffisamment puissante pour empêcher systématiquement l'incorporation d'un exon dès lors que l'autre est inclus.

Des variants alternatifs peuvent résulter d'utilisation de différents promoteurs ou sites de polyadénylation. Ces mécanismes s'apparentent en réalité plutôt à une transcription alternative mais sont fréquemment associés à l'épissage alternatif dans la littérature (Faustino and Cooper, 2003)(Corcos and Solier, 2005).

Cette synthèse d'ARNm alternatifs a des conséquences au niveau de la traduction en protéines. L'inclusion différentielle d'exons et d'introns peut non seulement conduire à la synthèse de protéines tronquées ou possédant une portion supplémentaire, mais peut également décaler le cadre de lecture et conduire à l'incorporation d'AA complètement différents modifiant ainsi la structure protéique. Un codon STOP peut également être inclus précocement, conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée. A l'inverse, le

décalage du cadre de lecture peut éliminer un codon stop et conduire à la synthèse d'une protéine plus longue.

Ce processus permet la production d'un nombre de protéines bien supérieur au nombre de gènes : en 2012, il était décompté 28 526 gènes composant le génome humain pour 120 145 transcrits dont 65% codants (Pal et al., 2012). Par ailleurs, 95% des gènes codant des protéines subiraient l'épissage alternatif (Pan et al., 2008).

I.3 Le spliceosome

La réaction d'épissage est catalysée par un ensemble de complexes ribo-protéiques nommés snRNP (small nuclear ribonucleoproteins). Chaque snRNP est formé par l'association d'un petit ARN (snRNA) d'environ 150 nucléotides (Fig 19) et de plusieurs protéines.

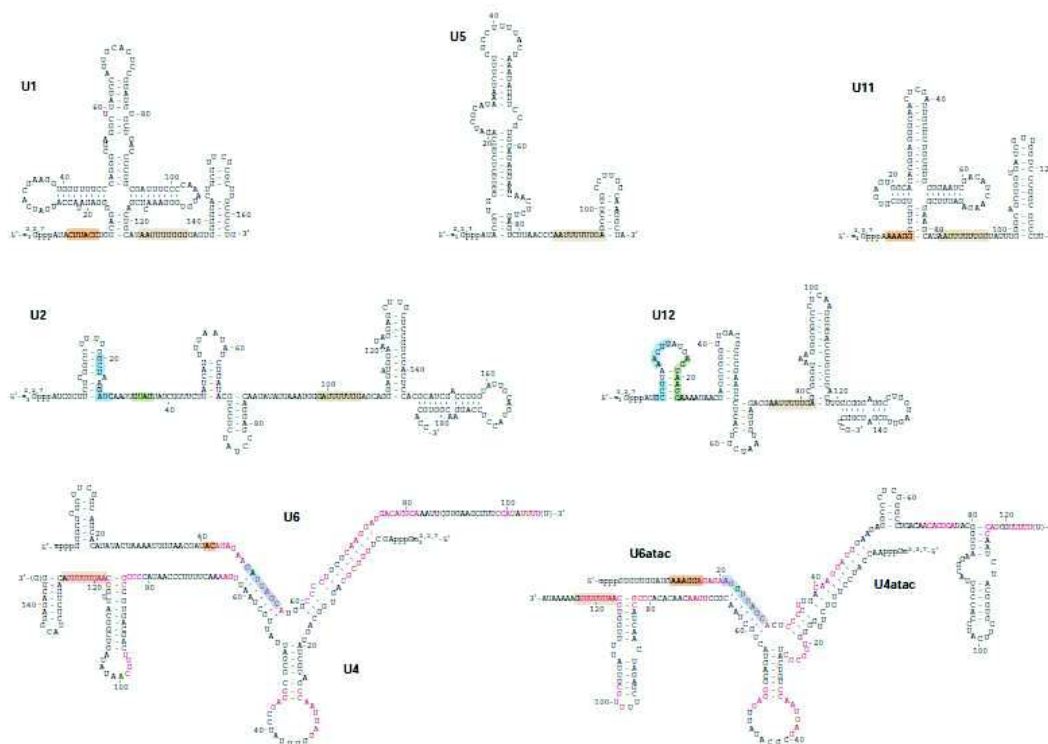


Figure 19: Séquence et structure des snRNA du spliceosome humain

Les snRNA homologues entre spliceosome majeur et mineur sont hautement similaires (U1-U11, U2-U12 et U6/U4-U6atac/U4atac). Les séquences de liaison aux protéines Sm sont surlignées en jaune. Les séquences supposées s'apparier avec les SD 5' et SA 3' sont respectivement surlignées en orange et vert. Les séquences surlignées en bleu sont impliquées dans les liaisons U6-U2 (et U6atac-U12 pour le spliceosome mineur).

D'après Abhijit & Steits, nat rev moll cell bio 2003

L'excision d'un intron par les réactions de trans-estérification vues précédemment nécessite la fixation de nombreux complexes snRNP sur l'ARNm.

Dans un premier temps, le snRNP U1 (nommé U1 si après) se fixe par complémentarité de séquence sur le SD en 5' de l'intron à exciser. En parallèle, le site de branchement est reconnu par le dimère de protéines auxiliaire de U2 U2AF-BBP (branchment binding protein) qui permet le recrutement de U2 au niveau du site de branchement suite au déplacement de BBP. La fixation de U2 sur le site de branchement laisse le résidu Adénosine (A) non apparié et expose son groupe hydroxyle 2' à une attaque nucléophile (Fig 20-I). U1 et U2 interagissent entre eux pour former le pré-spliceosome, également appelé complexe A. Le tri-snRNP pré-assemblé U4-U6/U5, dans lequel U4 et U6 sont fortement liés par une liaison ARN-ARN est recruté sur le pré-ARNm. L'appariement entre U4 et U6 est dissocié au profit d'un nouveau entre U2 et U6 (Fig 20-II). Ces changements conformationnels exposent le site donneur 5' ce qui permet à U6 de s'y fixer, puis U1 et U4 sont dissociés du spliceosome en cours de formation. Le recrutement du tri-snRNP déclenche également la fixation de U5 sur l'exon en amont du site donneur, ce qui maintient les exons à accoler à proximité l'un de l'autre au moment des attaques nucléophiles qui libèrent l'intron. Le complexe B, ainsi constitué et fixé au pré-ARNm, subi une nouvelle série de changements conformationnels permettant son activation nécessaire à la catalyse des réactions de trans-estérification libérant l'intron (Fig 20-III) (Patel and Steitz, 2003).

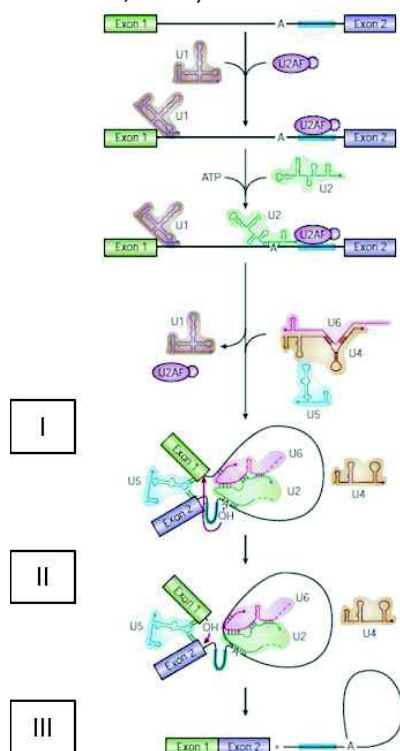


Figure 20: Assemblage du spliceosome et catalyse de l'épissage

L'assemblage du spliceosome majeur nécessite la reconnaissance des sites donneurs et de branchement par U1 et U2 (I) puis un rapprochement des exons à assembler grâce au tri-snRNP U4-U6/U5 (II). L'activation du spliceosome catalyse les réactions de trans-estérification pour joindre les exons et libérer l'intron (III).

Modifié de Abhijit Nat Rev Moll Cell Bio, 2003

L'assemblage du spliceosome nécessite la fixation et le relargage successif des snRNP ainsi que de nombreux changements conformationnels de ces complexes. Ces réactions sont catalysées par les hélicases, des enzymes capables d'ouvrir les appariements doubles brins d'acides nucléiques et de détacher les protéines fixées sur les brins ADN et ARN par leur activité translocase. De très nombreuses hélicases interviennent lors de l'épissage d'un pré-ARNm, et quelques une semblent primordiales pour l'assemblage du cœur du spliceosome (de la Cruz et al., 1999).

La formation du pré-spliceosome est caractérisée par la fixation de U1 et U2 sur l'intron, au niveau du site donneur et du site de branchement respectivement. La fixation de U2 nécessite la stabilisation du site de branchement ainsi qu'une dissociation du complexe BBP-U2AF préalablement fixé sur ce site de branchement (Liang and Cheng, 2015). L'hélicase PRP28 catalyse ensuite la dissociation entre U1 et le SD pour y autoriser la fixation d'U6, composant ainsi le complexe pré-catalytique du spliceosome (Möhlmann et al., 2014).

La dissociation de U6 et U4 est catalysée par BRR2 de manière à ce que U6 puisse s'associer à la fois à U2 et au site donneur en 5' (Zhang et al., 2015). Le complexe U6 est ensuite déplacé le long du pré-ARNm de manière à ce que le site donneur soit accessible pour la seconde réaction de trans-estérification pendant que PRP8 maintient les deux fragments d'ARNm issus de la première réaction à proximité (Koncz et al., 2012). La libération de l'ARNm après l'élimination de l'intron est catalysée par PRP22 qui dissocie le complexe U5 du SD (Koncz et al., 2012). Ces exemples expliquent la demande énergétique de l'épissage puisque bien que les réactions de trans-estérification ne consomment pas d'énergie, les hélicases fonctionnent grâce à l'hydrolyse de molécules d'ATP (de la Cruz et al., 1999).

Ils illustrent également la complexité de la machinerie impliquée dans l'épissage, puisqu'au total 300 protéines semblent intervenir dans les diverses réaction de catalyse et de régulation de l'épissage (Nilsen, 2003).

Une classe d'introns non conventionnels a été découverte, caractérisée par des séquences consensus d'épissage plus longues et mieux conservées que celles des introns classiques. Ils sont par ailleurs dépourvus de la séquence poly-pyrimidine en amont du site 3' (Turunen et al., 2013). Une partie de ces introns, dits « mineurs », possèdent des extrémités composées des nucléotides AT et AC contrairement aux GT et AG fréquemment observés aux extrémités des introns classiques.

L'épissage de ces introns nécessite l'intervention d'un spliceosome dit « mineur » composé par des snRNP aux fonctions similaires mais de structures différentes. Les réactions de trans-estérifications, menant à l'excision de l'intron sont identiques à celles observées lors de l'excision d'un intron « majeur ».

II. La régulation de l'épissage

L'épissage d'un ARNm nécessite l'identification des exons au milieu des séquences introniques en moyenne 20 fois plus longues. Cela passe par la reconnaissance des sites consensus par le spliceosome préalable à sa fixation sur le pré-ARNm. De nombreux paramètres influencent la capacité de recrutement de ces séquences: la structure et la composition de l'ARNm, la présence de séquences régulatrices et la régulation de la fonction de protéines activatrices et inhibitrices de l'épissage en sont les principaux.

II.1 L'épissage dépend de caractéristiques intrinsèques du pré-ARNm

II.1.1 La taille des exons et introns

La longueur des séquences introniques et exoniques influencent largement l'efficacité d'épissage.

Concernant les exons, une taille comprise entre 50 et 300 nucléotides garantit une inclusion efficace de l'exon. Un exon trop grand ne pourra être inclus ou alors le sera en plusieurs petits exons distincts par utilisation de sites d'épissage cryptiques. Une étude menée chez le singe sur 1600 exons révèle que seuls 3.5% des exons ont une taille supérieure à 300pb (Berget, 1995).

Un exon de taille inférieur à 10pb sera également très difficilement inclus en raison d'un rapide encombrement stérique autour du complexe du spliceosome.

La longueur des introns est également un frein à l'insertion des exons adjacents. De la taille des introns dépend entre autre le positionnement des sites d'épissage. Si en moyenne ce sont des séquences d'environ 3000pb, de très petits introns ont été identifiés (Sasaki-Haraguchi et al., 2012). L'épissage sera dans ces cas possible, mais nécessitera parfois l'intervention de protéines régulatrices non-conventionnelles.

II.1.2 La force de la séquence

Une étape critique de l'assemblage du spliceosome est la reconnaissance des sites 5' et 3'. Alors que le site donneur 5' est constitué d'une seule séquence de 8 nucléotides, le site accepteur 3' est composé de 3 séquences que sont le site de branchement, le tractus pyrimidique et le site 3' à la jonction intron-exon

(Hertel, 2008). Plus l'affinité entre ces différentes séquences et le snRNP est importante, plus l'assemblage du spliceosome est efficace.

Cette affinité entre le pré-ARNm et les composants du spliceosome dépend de la longueur et de la composition de la séquence. Par exemple, la force d'une séquence polypyrimidique dépend de sa richesse en pyrimidine, de sa longueur et de la proximité avec le site accepteur 3' (Coolidge et al., 1997).

Dans le cas de séquences dites « faibles », d'autres séquences de l'ARNm sont nécessaires pour le recrutement des composants du spliceosome.

II.1.3 La structure secondaire du pré-ARNm

L'association de certains facteurs d'épissage dépend de la structure secondaire et tertiaire de l'ARN à épisser. Les repliements par appariement de bases peuvent masquer les sites d'épissage et conduire à l'exclusion d'un exon ou empêcher la fixation du spliceosome ou des protéines régulatrices. A l'inverse, le rapprochement de sites d'épissage par une structure secondaire facilite l'excision de l'intron concerné, accélérant ainsi l'épissage. Un exemple bien caractérisé est l'épissage de l'exon EDA du gène de la *fibronectine* : une séquence exonique activatrice d'épissage est stabilisée par une structure en tige/boucle la rendant accessible aux protéines régulatrices (Buratti et al., 2004).

L'ensemble de ces critères définit la facilité d'inclusion d'un exon. Les exons dits constitutifs sont les exons systématiquement incorporés dans l'ARNm mature. Ce sont en général des exons de 50 à 300 nucléotides entourés de sites d'épissage forts, facilitant leur insertion. A l'inverse, les exons alternatifs sont souvent plus petits et les sites d'épissages à leurs extrémités sont faibles. Des séquences régulatrices permettant d'augmenter le recrutement du spliceosome seront alors nécessaires pour activer leur épissage.

II.2 L'action des protéines régulatrices

Les protéines régulatrices sont recrutées au sein du pré-ARNm au niveau de séquences particulières appelées séquences régulatrices ou éléments régulateurs. Ce sont des petites séquences de quelques nucléotides (entre 4 et 18) reconnues par des protéines auxiliaires qui, une fois fixées, modulent l'assemblage du spliceosome. Elles peuvent être introniques ou exoniques selon leur localisation dans le pré-ARNm et sont qualifiées d'inhibitrices (silencers) ou activatrices (enhancers) si elles facilitent ou non l'accès au site d'épissage dont elles sont voisines. Il existe ainsi 4 types de séquences régulatrices: les séquences activatrices exoniques (ESE), inhibitrices exoniques (ESS), activatrices introniques (ISE) et inhibitrices introniques (ISS).

La majorité des protéines régulatrices appartient à deux grandes familles : les familles SR et hnRNP qui modulent l'assemblage du spliceosome autour des sites d'épissage.

II.2.1 Les protéines de la famille SR

II.2.1a Structure

Les protéines SR (riches en Serin Arginin) composent la famille la mieux caractérisée des protéines régulatrices d'épissage. Les membres de cette famille ont une structure commune composée d'un domaine C-ter riche en dipeptides arginine-serine nommé domaine RS ainsi qu'au moins un domaine de liaison à l'ARN (RNA recognition motif, RRM). Basée sur ces critères, la famille de protéines SR dénombrait en 2011 12 membres (Fig 21).

Le domaine RS permet les interactions avec d'autres protéines porteuses d'un domaine similaire, et est nécessaire à la localisation nucléaire des protéines.

Les domaines RRM permettent la fixation sur le pré-ARNm, et la dégénérescence des séquences régulatrices permet à plusieurs protéines SR de se fixer sur une même séquence.

La première protéine de cette famille à avoir été identifiée est SRSF1 également appelée ASF/SF2. Son implication dans l'épissage a été démontrée grâce à sa capacité à restaurer l'épissage dans des extraits cytoplasmiques dépourvus de facteurs d'épissage. Les autres membres de cette famille ont été par la suite identifiés grâce à un AcMo spécifique du domaine SR phosphorylé.

Cette famille de protéine est présente chez la majorité des eucaryotes, mais absente chez la levure *saccharomyces cerevisiae* dépourvue d'épissage alternatif, laissant supposer un rôle prépondérant dans ce processus.

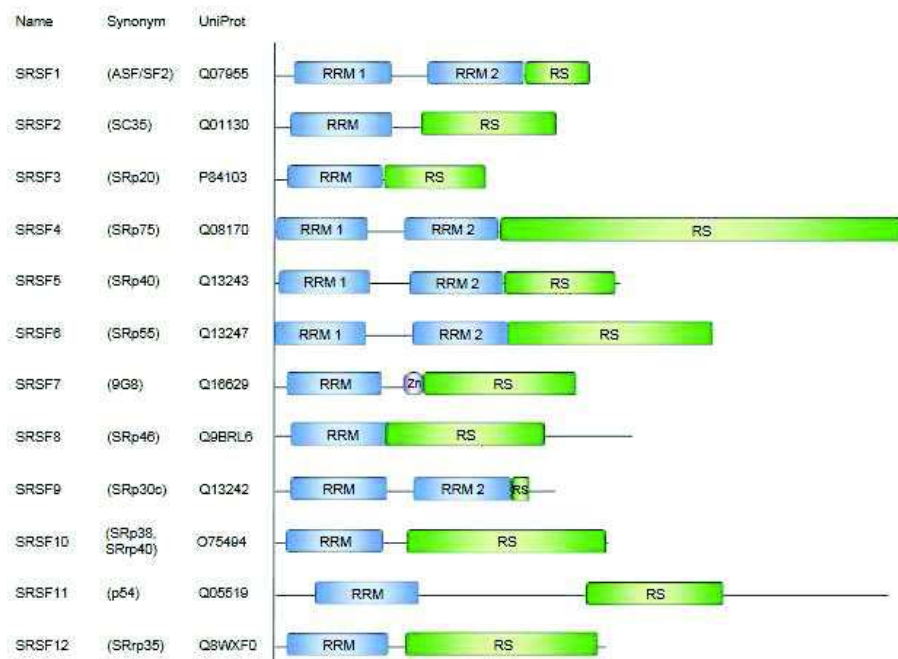


Figure 21: Structure schématique des protéines de la famille SR

Plusieurs noms ont été attribués à une même protéine SR. Elles seront ici nommées selon la nomenclature la plus récente, SRSF1 à SRSF12. Toutes les protéines possèdent un domaine riche en résidus sérine et arginine (RS) C-ter ainsi qu'au moins un domaine de liaison à l'ARN (RRM) en N-ter.

D'après Twyffels et al, Cell Molecular Biology 2011

II.2.1b Fonction

Les protéines SR modulent l'assemblage et l'activation du spliceosome selon divers mécanismes en fonction du contexte de l'épissage et principalement de la force des sites d'épissage. Ces mécanismes peuvent être dépendants du domaine SR, du domaine RRM ou des deux.

Lors de l'épissage d'un exon constitutif, les sites d'épissage et la structure de l'exon permettent une fixation aisée des composants du spliceosome et des facteurs auxiliaires sur le pré-ARNm. Dans ce cas, les protéines SR facilitent le recrutement des protéines d'épissage via leur domaine SR sans se fixer à l'ARNm sur une séquence régulatrice (Fig 22-a). C'est notamment le cas de SRSF1 et SRSF2 qui agissent à un stade très précoce de l'épissage en interagissant respectivement avec U1 snRNP et le facteur auxiliaire U2AF₃₅ qui permet la fixation de U2 snRNP au niveau du SB.

Ces interactions stabilisent l'assemblage du spliceosome puis juxtaposent les sites donneurs et accepteurs afin de rendre les réactions de trans-estérifications possibles. Des protéines apparentées à la famille SR interviennent également, en permettant entre autres le recrutement du tri-snRNP U4/U6-U5 en fonctionnant de la même manière que les protéines SR (Shepard and Hertel, 2009).

En revanche, l'inclusion d'un exon alternatif nécessite l'intervention de séquences régulatrices afin de pallier la faiblesse des sites d'épissage bordant ces exons.

Les sites accepteurs alternatifs 3' par exemple peuvent être caractérisés par une séquence polypyrimidique approximative difficilement reconnue par U2AF₆₅. Ces séquences alternatives faibles ne suffisent pas à recruter le spliceosome en l'absence de protéines SR associées en raison d'une trop faible affinité d'U2AF₆₅. La présence de protéines SR fixées sur une ESE de l'exon en aval est alors nécessaire pour activer l'assemblage et l'action du spliceosome au niveau de l'intron adjacent (Fig 22-b).

Dans le cas d'un site d'épissage fort, pour lequel les protéines du spliceosome ont une forte affinité, la simple fixation de la protéine SR sur le pré-ARNm via son domaine RRM facilite l'épissage en bloquant l'action des protéines inhibitrices fixées sur le même exon aval (Fig 22-c).

Le remplacement de la séquence pyrimidique normale d'un pré-ARNm par une séquence présentant une affinité pour U2AF₆₅ accrue rend l'épissage de l'intron indépendant des facteurs activateurs normalement nécessaires.

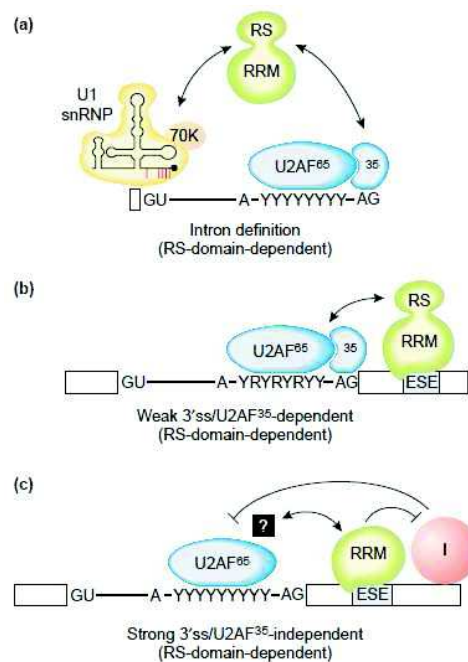


Figure 22: Modes d'action des protéines SR

(a) Le domaine RS est nécessaire au recrutement de protéines snRNP dans le cas d'épissage par définition d'introns.

(b) Les domaines RRM et RS sont nécessaires lors d'épissage utilisant un site faible, tel qu'un site polypyrimidique pauvre en résidus pyrimidines. La protéine SR se lie alors à une séquence exonique activatrice d'épissage (ESE).

(c) Le domaine SR n'est pas nécessaire lors d'un épissage utilisant un site fort.

D'après Hastings & Krainer, Curr Opin Cell Bio 2001

De manière intéressante, il a été observé qu'un même complexe de protéines SR fixées sur une ESE pouvait activer la reconnaissance simultanée d'un site accepteur 3' de l'intron amont et du site donneur 5' d'un intron aval.

Les protéines SR peuvent également participer à la reconnaissance du site donneur après la fixation de U1 en interagissant avec U6. Cela a été montré par la restauration de l'épissage dans des extraits dépourvus d'U1 par ajout de protéines SR. L'épissage est dans ce cas rendu possible grâce au recrutement de U6 au niveau du site 5', ce qui constitue normalement une étape plus tardive de l'assemblage du spliceosome.

Si les protéines SR semblent majoritairement favoriser l'inclusion d'un intron, il a également été démontré qu'elles pouvaient promouvoir le saut d'exon. Ce paradoxe s'explique par la position de la protéine SR sur le pré-ARNm : une protéine SR fixée à l'intérieur d'un exon alternatif promeut son inclusion alors que la fixation de ces mêmes protéines sur les exons de part et d'autre de l'exon d'intérêt conduit à son excision. (Han et al., 2011).

En se fixant sur des ESE, les protéines SR contribuent à l'activation de l'épissage en empêchant l'action de facteurs inhibiteurs : alors que hnRNP A1 favorise l'utilisation d'un site donneur 5' éloigné de la séquence sur lequel elle est fixée, SRSF1 promeut l'utilisation du site 5' le plus proche afin d'empêcher le saut d'exon.

II.2.2 Les protéines de la famille hnRNP

II.2.2a Structure

Les membres de cette famille, au moins au nombre de 24, sont également caractérisés par la présence de domaines particuliers séparés par des domaines de liaisons (Fig 23). Le domaine le plus fréquemment observé est un domaine RRM de liaison à l'ARNm. Les hnRNP dépourvues de RRM peuvent se lier à l'ARN grâce à un domaine KH (homologie K, en référence à la protéine hnRNP K chez laquelle ce domaine a été pour la première fois identifié), un domaine qRRM de structure sensiblement différente des RRM canoniques ou encore un domaine riche en glycine (Fig 23). Les domaines RGG observés chez une majorité des hnRNP sont nommés ainsi en raison du tri-peptides Arginine-Glycine-Glycine les constituant.

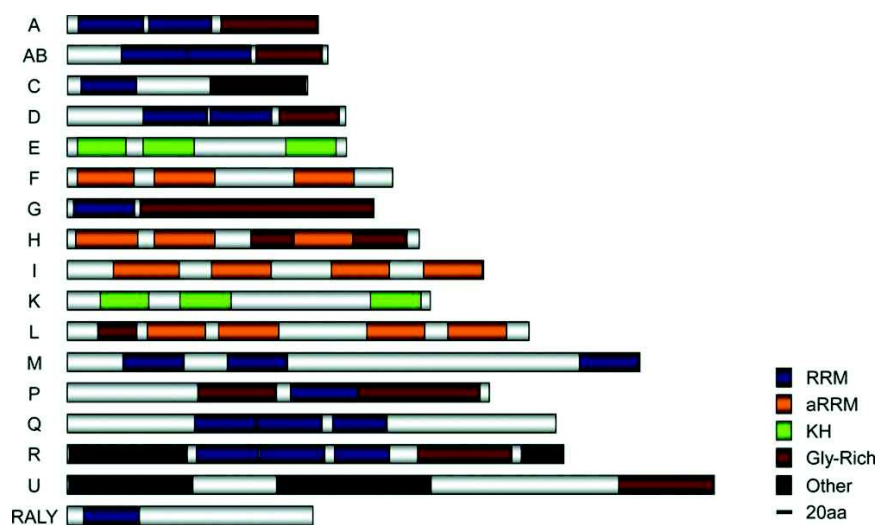


Figure 23: Structure schématique des protéines hnRNP

La structure des hnRNP est plus hétérogène que celle des protéines SR. « A » représente les hnRNP A0, A1, A2/B1 et A3 qui ont une structure similaire. Les protéines dépourvues de domaines RRM peuvent se lier via un domaine riche en glycines (GLY-Rich), un domaine K ou un domaine homologue aux RRM (aRRM).

D'après Siew Ping Han, Biochem J 2010

II.2.2b Fonctions

Les hnRNP sont le plus souvent des répresseurs de l'épissage principalement impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif. Leur principal mode d'action est d'entrer en compétition avec les protéines du spliceosome, empêchant ainsi leur fixation au pré-ARNm. Le rôle de chaque hnRNP n'est pas encore systématiquement compris et à l'heure actuelle, aucune preuve n'est faite de l'implication des protéines A0, A3, A/B, D, DL et U dans l'épissage (Han et al., 2010).

Les protéines A1, A2, F, H/H' et 2H9 ont en commun un domaine riche en glycine. Ces protéines sont parmi les mieux caractérisées et peuvent réguler l'épissage de plusieurs manières.

Leur fixation sur des ESS masque les ESE par encombrement stérique ce qui empêche l'intervention des protéines SR (Fig 24-A). De larges complexes hnRNP peuvent également se former le long du pré-ARNm après fixation d'une molécule sur un ESS distal : ces complexes masquent ensuite les sites d'épissage éloignés de l'ESS et empêchent directement la fixation des composants du spliceosome (Fig 24-B).

Si ces deux premiers mécanismes répriment clairement l'épissage en bloquant l'accès du spliceosome au pré-ARNm, un troisième mécanisme de régulation de l'épissage alternatif permet de forcer l'épissage entre deux exons afin d'éliminer un exon intermédiaire favorisant ainsi le saut d'exon. Pour ce faire, deux hnRNP se fixent sur les introns de part et d'autre de l'exon à exciser et interagissent entre elles pour former

une boucle contenant l'exon. De cette manière deux exons distaux sont rapprochés, leurs sites d'épissages respectifs aisément accessibles pour le spliceosome seront utilisés, et l'exon intermédiaire éliminé (Fig 24-D).

La protéine PTB (Poly-pyrimidine Tract Binding) est un important répresseur de l'épissage et fonctionne de manière similaire aux hnRNP A et H. PTB est spécifique de courtes séquences riches en di-nucléotides CU, fréquemment observées au niveau d'exons dont l'épissage est régulé. Une des principales zones de fixation de PTB est par conséquent le tractus pyrimidique, riche en CU. La fixation de PTB sur ces séquences altère l'assemblage du spliceosome en bloquant la fixation de U2AF₆₅ par compétition sur le tractus poly-pyrimidique. La présence de nombreux sites de liaison de PTB est souvent nécessaire à la répression de l'épissage même si parfois un seul site suffit à bloquer l'interaction entre U1 et U2AF₆₅. Cela empêche la correcte définition d'intron, nécessaire à l'activation du spliceosome (Sharma et al., 2008).

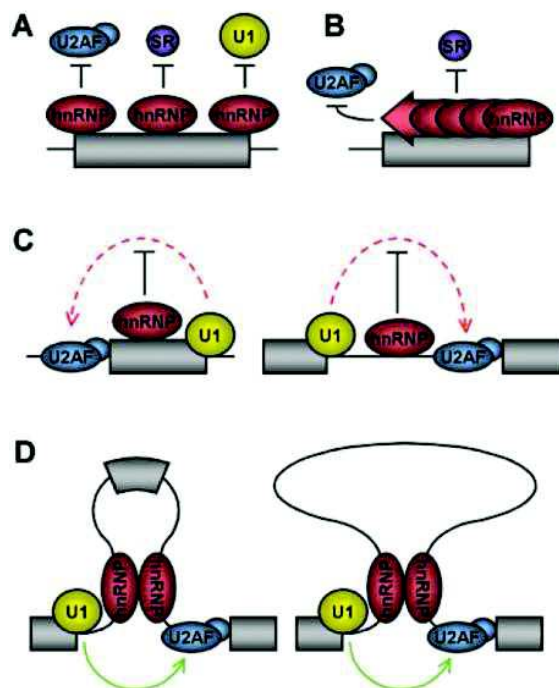


Figure 24: Modes d'action des protéines hnRNP

(A) La fixation de hnRNP à proximité de sites d'épissage bloque l'accès de ces sites aux facteurs d'épissage.

(B) La fixation de hnRNP sur un site plus distal d'un site d'épissage peut conduire à une polymérisation de hnRNP le long de l'exon et empêcher la fixation de facteurs d'épissage en amont ou en aval.

(C) La fixation d'une snRNP sur un exon ou un intron empêche la définition d'exon et d'intron respectivement.

(D) L'interaction entre 2 hnRNP induit l'excision de l'ARN situé entre les deux protéines. Si elles sont sur le même intron, seul l'intron est excisé mais si elles sont sur deux introns séparés par un exon, le tout est excisé.

D'après Martinez Contreras et al, Adv Exp Med Biol 2007

A l'inverse, la fixation de protéines SR sur un élément ISE peut interférer dans la reconnaissance des sites 5' et 3' et ainsi inhiber l'excision de l'intron démontrant l'importance de la localisation de l'élément régulateur (Erkelenz et al., 2013) (Zhou and Fu, 2013).

II.2.3 Les voies de signalisation régulant l'épissage

Les protéines SR et hnRNP et plus largement les répresseurs et activateurs de l'épissage fonctionnent majoritairement par effet antagoniste. La fixation de protéines activatrices empêche l'action des inhibitrices et inversement. Ce blocage résulte d'encombrement stérique ou d'inhibition directe. De ce fait, un élément prépondérant de la régulation est le ratio de protéines activatrices et régulatrices au moment de l'épissage. Il a été par exemple montré par l'équipe de Krainer que le ratio entre SRSF1 et hnRNP A1 est déterminant pour la sélection d'un site d'épissage 5' lors de l'excision d'un intron: SRSF1 promeut l'utilisation du site d'épissage proximal alors que hnRNP A1 favorisera l'utilisation d'un site plus distal en bloquant l'accès au premier (Mayeda and Krainer, 1992).

La régulation de la quantité des protéines régulatrices au moment de l'épissage est donc primordiale. La fonction et la localisation subcellulaire sont en grande partie régulées par des modifications post-traductionnelles dont la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation.

Parmi les différentes modifications post-traductionnelles impactant l'épissage la phosphorylation est probablement la plus influente et la mieux caractérisée. Ce processus contrôle la localisation et la fonction des protéines SR et hnRNP mais également les interactions protéines-protéines et protéines-mRNA.

La phosphorylation module la fonction des protéines régulatrices de l'épissage. Dans la majorité des cas, l'état de phosphorylation correspond à un statut d'activation: la phosphorylation de la kinase AKT l'active et une déphosphorylation l'inactive (Liu et al., 2014).

Mais dans d'autres cas, le changement de statut de phosphorylation inverse la fonction protéique : SRSF10 est activatrice de l'épissage sous sa forme phosphorylée mais devient inhibitrice lorsqu'elle est déphosphorylée (Shin and Manley, 2002) (Feng et al., 2008).

La localisation et le transport des facteurs d'épissage sont également dépendants du statut de phosphorylation (Naro and Sette, 2013a): le niveau de phosphorylation des protéines SR doit être faible pour permettre leur import nucléaire, puis fort afin de permettre l'assemblage du spliceosome. L'activation du spliceosome et donc la catalyse de l'épissage nécessite en revanche une diminution du niveau de phosphorylation des SR et donc une déphosphorylation partielle. Une fois l'épissage terminé, l'ARNm doit être exporté vers le cytoplasme afin d'y être traduit. Cet export se fait grâce aux protéines SR

associées au transcrit qui doivent alors être intégralement déphosphorylées pour être exportées (Fig 25). Des cycles successifs de phosphorylation/déphosphorylation sont donc nécessaires à la catalyse de l'épissage (Naro and Sette, 2013b).

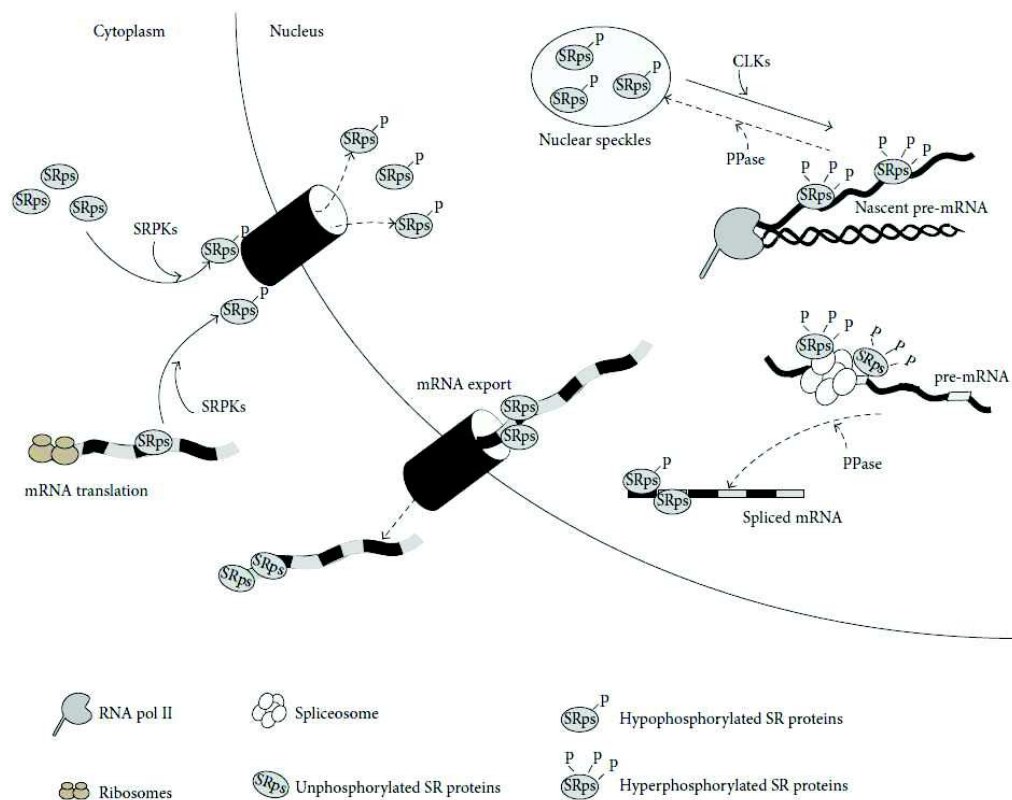


Figure 25: La phosphorylation régule l'activité des protéines SR

Des cycles de phosphorylation/déphosphorylation conditionnent la localisation sub-cellulaire des protéines SR. L'action de SRPK induit l'entrée des SR dans le noyau où elles sont regroupées au sein de granules nucléaires. Un second cycle de phosphorylation par les CLK libère les SR de ces granules pour faciliter l'assemblage du spliceosome. L'action de phosphatases catalyse l'épissage et regroupe les SR au sein des granules nucléaires. Une déphosphorylation complète exporte les SR associées au pré-ARNm épissé vers le cytoplasme.

Niara & Sette, *Int J Cell Bio*, 2013

La localisation sub-cellulaire des hnRNP est également modulée par des modifications post-traductionnelles, mais le résultat est inverse à celui observé pour les protéines SR (Xie et al., 2003). La phosphorylation de hnRNP K par la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK suite à un stimulus extra-cellulaire provoque sa rétention cytoplasmique (Habelhah et al., 2001). Le même résultat est constaté lors

de la phosphorylation de hnRNP A1 par p38-MAPK lors d'un stress cellulaire (van der Houven van Oordt et al., 2000).

Deux grandes familles de protéines kinases sont responsables de la majorité des phosphorylations des protéines de l'épissage : les familles SRPK et CLK.

Les protéines SRPK sont associées à de nombreuses protéines chaperonnes cytoplasmiques, et suite à la transduction de signaux intracellulaires transloquent dans le noyau grâce au recrutement d'autres chaperonnes telles que HSP90 (Zhong et al., 2009). Elles phosphorylent les domaines RS des protéines SR sur 10 à 12 résidus sérines, principalement au niveau de dipeptides sérine-arginine.

Les protéines CLK (Cyclin-dependant like kinase) interagissent avec les protéines SR au sein de granules nucléaires et ne sont pas exprimées au niveau cytoplasmique. La phosphorylation se déroule sur des résidus sérine au niveau de dipeptides sérine-proline, sérine-lysine et sérine-arginine.

L'acétylation peut également participer à la régulation de la transcription : Choudhary a montré en 2009 que les domaines RRM des protéines régulatrices de l'épissage étaient des sites fréquents d'acétylation (Choudhary et al., 2009). L'acétylation de protéines impliquées dans l'épissage pourrait ainsi modifier leur stabilité, leur transport intra-cellulaire et donc leur localisation ou encore leur faculté d'interaction. Elle empêche également leur dégradation en bloquant l'ubiquitinylation.

La méthylation est un processus de contrôle de l'expression génique primordial chez les eucaryotes. L'ajout de résidus méthyl au niveau d'ilots CpG de promoteurs contrôle la transcription des gènes de manière complexe.

En plus de contrôler la transcription, la méthylation est impliquée dans la régulation de l'épissage des ARNm. Il a été constaté que le niveau de méthylation était plus important au niveau des exons constitutivement inclus qu'au niveau d'exons alternatifs (Lev Maor et al.). La méthylation pourrait participer à la distinction des exons et des introns, ainsi qu'à l'inclusion de certains exons par recrutement de facteurs régulateurs (Yearim et al., 2015) (Fig 26).

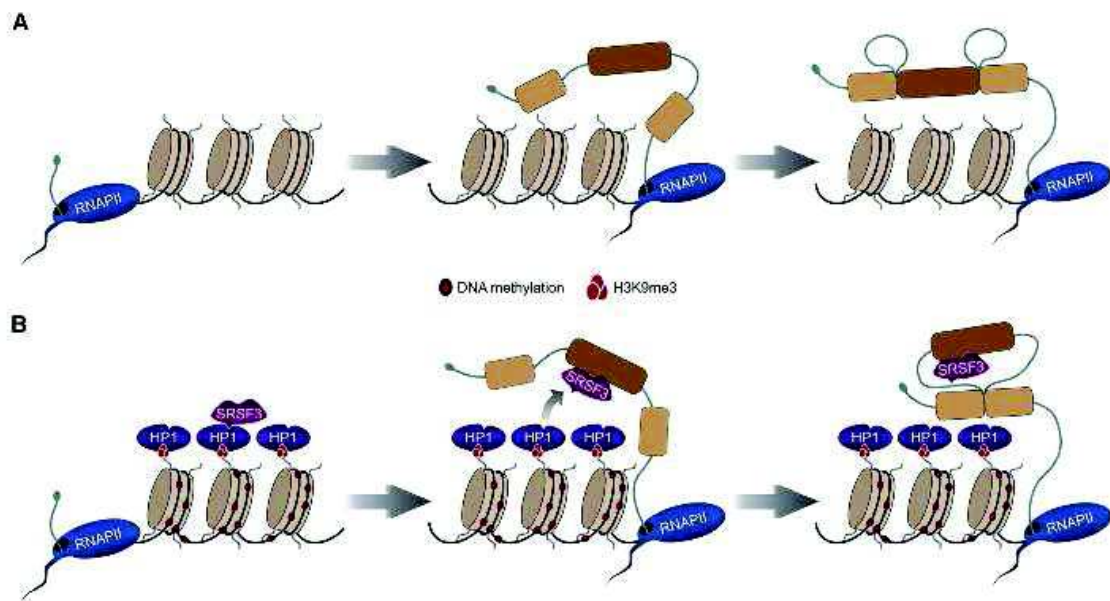


Figure 26: La méthylation de l'ADN module l'épissage

(A) Lorsque l'ADN est non méthylé, l'exon alternatif (marron foncé) est inclus dans le transcrit mature.

(B) Lorsque l'ADN est méthylé, les protéines de la famille HP1 (hétérochromatin proteins 1) interagissent avec les histones méthylées et recrutent des facteurs régulateurs de l'épissage tels que SRSF3 ce qui favorise l'exclusion de l'exon alternatif.

D'après Yearim et al, Cell Reports 2015

L'ajout de groupements méthyl peut également intervenir sur les résidus lysines de polypeptides tels que les facteurs régulateurs de l'épissage.

La méthylation de hnRNP K empêche certaines interactions avec les pré-ARNm dont hnRNP K régule l'épissage (Yang et al., 2014).

Il a également été démontré qu'une tri-méthylation de SRSF1 était nécessaire à sa correcte localisation nucléaire, et qu'une déméthylation entraînait une rétention cytoplasmique qui participe à l'origine de l'activité oncogénique de SRSF1 par dérégulation de l'épissage (Sinha et al., 2010).

La méthylation pourrait également modifier la localisation subcellulaire des hnRNP : la présence dans le cytoplasme de hnRNP A2 pourrait être conditionnée par la méthylation de son domaine RGG (Nichols et al., 2000) même si ces résultats ont été contredits lors d'une autre étude menée chez le rat (Friend et al., 2013).

III. Épissage alternatif et cancer

La production de certaines isoformes protéiques par épissage alternatif a été associée au développement de pathologies dont les cancers (Venables, 2004). Les gènes et protéines concernés sont impliqués dans la

majorité des processus intervenant dans le développement tumoral : la prolifération, le contrôle du cycle cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion ou encore l'apoptose (Oltean and Bates, 2013) (Ghigna et al., 2008).

L'importance de la compréhension des liens entre épissage et cancer réside dans l'identification de nouveaux biomarqueurs, ainsi que de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.

III.1 Les aberrations de l'épissage au cours de l'oncogenèse

Plusieurs anomalies de la régulation de l'épissage peuvent conduire à la production de protéines apportant un avantage prolifératif à la cellule. Ces anomalies touchent l'ensemble des éléments intervenant lors de l'épissage : les composants du spliceosome, les séquences du pré-ARNm mais aussi les facteurs régulateurs.

III.1.1 Les anomalies des séquences régulatrices (mutations)

Des mutations du pré-ARNm au niveau des sites d'épissage ou des éléments régulateurs altèrent la fixation des snRNP ou des facteurs régulateurs et provoquent des épissages anormaux pouvant être impliqués dans l'oncogenèse ou l'invasion tumorale.

La mutation d'un seul nucléotide suffit à modifier voire éliminer une séquence ESE, ce qui diminue ou empêche leur reconnaissance par des protéines régulatrices pour une ESE.

C'est le cas lors de la survenue d'une mutation du gène suppresseur de tumeur *brca1*. La protéine BRCA1 codée par ce gène est impliquée dans la réparation de l'ADN et la régulation transcriptionnelle. Une mutation G→T en position 6 de l'exon 18 modifie une séquence ESE qui n'est alors plus reconnue par SRSF1, empêchant ainsi l'inclusion de l'exon 18 (Liu et al., 2001). La protéine tronquée qui en résulte voit sa fonction altérée ou abolie, ce qui provoque des accumulations de mutations non corrigées responsables du développement de tumeurs mammaires ou ovariennes.

Des anomalies génétiques telles que les mutations ou délétions altèrent également le choix des sites d'épissages.

Une délétion au niveau de l'exon 11 du gène codant *c-kit* entraîne la création et l'utilisation d'un site 3' plus en aval de l'exon, ce qui conduit à la synthèse d'un récepteur tronqué dépourvu des AA responsables de son auto-inhibition et donc constitutivement activé (Chen et al., 2005). Les mutations de *c-kit* sont responsables de la transformation maligne dans 90% des tumeurs stromales gastro-intestinales, et des délétions de l'exon 11 représentent plus de 70% de ces mutations et sont associées à un mauvais pronostic de survie (Rubió-Casadevall et al., 2015).

Le gène suppresseur de tumeur *bap1* est également la cible de mutations altérant l'épissage alternatif. C'est une mutation homozygote au niveau de l'exon 16 qui provoque la création d'un nouveau site donneur 5' qui abolit complètement l'épissage normal du gène. Plusieurs variants alternatifs ont été identifiés : la plupart codent une protéine tronquée en raison d'une délétion de 4 paires de bases au niveau de l'ARNm, mais des rétentions d'introns sont également constatées (Morrison et al., 2015).

La production de variants alternatifs aberrants est en partie contrôlée par le mécanisme de dégradation des ARNm non-sens, qui vise à éliminer les ARNm qui comportent un codon STOP prématuré suite à une erreur de transcription, une mutation ou une erreur d'épissage (Broyna and Wen, 2009). Des complexes de jonctions d'exons (EJC) sont déposés sur l'ARNm au cours de l'épissage à proximité des jonctions entre exons et sont exportés vers le cytoplasme avec l'ARNm mature. Ces EJC sont éliminés par le ribosome au fur et à mesure de la première traduction de l'ARNm : si un codon stop prématuré existe, des EJC restent fixés entre le ribosome et l'extrémité 3' de l'ARNm au moment de l'arrêt de la traduction, ce qui constitue un signal de dégradation de l'ARNm (Fig 27).

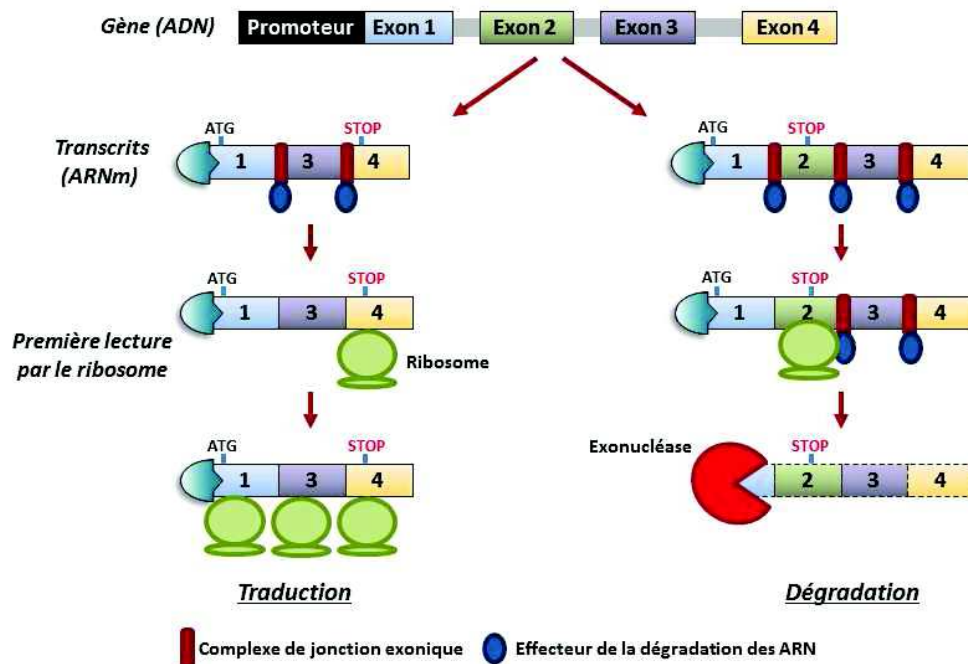


Figure 27: Mécanisme de dégradation des ARNm non-sens (NMD)

Après l'épissage, un complexe de jonction exonique reste associé à l'ARN au niveau des jonctions exon-exon. Lors de la première traduction, ces complexes protéiques sont éliminés de l'ARN par le ribosome. Si un codon STOP prématuré a été inséré, par mutation ou rétention d'intron par exemple, le ribosome s'arrête alors que des EJC sont encore associés à l'ARNm ce qui constitue un signal de dégradation.

<http://www.crcl.fr/547-Grand-public.crcl.aspx?language=fr-FR>

Un mécanisme de sauvetage peut intervenir en amont de la traduction pour empêcher la dégradation systématique des ARNm anormaux, en éliminant l'exon comportant le codon STOP anormal pour poursuivre la traduction.

Le saut d'exon peut également être provoqué par une mutation créant une séquence régulatrice de type ESS sur laquelle des protéines régulatrices de l'épissage telles que celles de la famille hnRNP peuvent se fixer afin d'empêcher l'utilisation des sites d'épissage voisins. Ce phénomène est très peu décrit dans la littérature mais a été identifié comme responsable d'une pathologie non-cancéreuse : la mucoviscidose. Cette maladie est causée par des mutations du gène codant la protéine CFTR responsable du transport d'ions chlorure au niveau des cellules épithéliales. La mutation R553X fréquemment observée chez les patients conduit à la création d'un élément ESS qui empêche la sélection du site donneur 5' en aval de l'exon 11. L'exclusion de l'exon 11 qui en résulte conduit à la synthèse d'un canal ionique tronqué dont l'inefficacité est responsable des troubles respiratoires et gastriques dont souffrent les malades (Aznarez et al., 2007).

III.1.2 Les anomalies des protéines de l'épissage

Des anomalies de l'expression ou de la fonction des protéines des snRNP ou des protéines régulatrices de l'épissage sont largement associées à des épissages altérés impliqués dans la survenue de cancers.

III.1.2a SF3B1

Depuis quelques années, de nombreuses études ont identifié des mutations du gène codant SF3B1, une sous unité du complexe U2 chargé de se lier à une région de 25 nucléotides en amont du site de branchement.

L'étude de 2322 patients atteints de LLC avant traitement montre une mutation du gène *sf3b1* dans 11% des cas. La fréquence de mutations est plus importante chez les patients atteints d'une pathologie à un stade plus avancé, et est associée à une nécessité de traitement plus précoce (Baliakas et al., 2015) (Wang et al., 2011). Ce mauvais pronostic serait la conséquence d'une instabilité génomique causée par une altération de la protéine SF3B1, entraînant des anomalies des voies de réparation de l'ADN. Cette hypothèse est confortée par l'augmentation d'histone H2A phosphorylée, marqueur des cassures doubles brins, dans les cellules porteuses d'une mutation de *sf3b1* (te Raa et al., 2014).

Ces mutations sont associées à une dérégulation de l'épissage de nombreux gènes impliqués dans les cancers : alors que chez les patients non mutés le site donneur 5' canonique est utilisé, un site cryptique est fréquemment utilisé chez les patients porteurs de mutations (DeBoever et al., 2015).

La stabilisation de SF3B1 semble altérée lors de mutations du gène, ce qui empêcherait une stabilisation correcte du complexe du snRNP U2 et donc une mauvaise reconnaissance du site canonique.

III.1.2b SRSF1

Le facteur régulateur d'épissage SRSF1 est impliqué à de nombreuses étapes du métabolisme de l'ARNm : la transcription, l'export nucléaire, la dégradation des ARNm non-sens, mais aussi la traduction et la stabilité génomique (Das and Krainer, 2014).

SRSF1 est surexprimé dans de nombreux cancers et a été identifié comme un oncogène impliqué dans l'épissage de gènes participant à tous les processus biologiques permettant l'oncogenèse : une prolifération et une capacité d'invasion accrue (Shimoni-Sebag et al.)(Ghigna et al., 2005), une réponse aux facteurs de croissance suractivée ou encore une angiogenèse dérégulée (Gammons et al., 2014).

Trois gènes régulateurs de l'apoptose voient également leur épissage contrôlé par SRSF1 : *bin1*, *bim* et *mcl-1* peuvent coder des variants pro ou anti-apoptotiques par épissage alternatif. Dans ces 3 exemples, une surexpression de SRSF1 promeut la production des protéines anti-apoptotiques au détriment des isoformes pro-apoptotiques, confirmant le statut d'oncogène de *srsf1*(Shimoni-Sebag et al.).

Par ailleurs, l'expression de SRSF1 est en partie régulée par le facteur de transcription MYC qui est dérégulé dans de nombreux cancers, ainsi que par le régulateur d'épissage Sam68 qui restaure les ARNm destinés à être dégradés en ARNm éligibles à la traduction, augmentant ainsi la quantité de protéines SRSF1 disponibles (Das et al., 2012) (Valacca et al., 2010).

III.1.2c hnRNP

Les protéines de la famille hnRNP sont également impliquées dans les dérégulations de l'épissage associées à l'oncogenèse.

Une surexpression de hnRNP A2/B1 dans les glioblastomes a notamment été corrélée à un mauvais pronostic (Golan-Gerstl et al., 2011). Le gène codant cette protéine a été considéré comme un proto-oncogène potentiel puisque sa surexpression dans des lignées immortalisées conduit à une transformation maligne des cellules. Parmi les cibles de hnRNP A2/B1 se trouve le gène *ron*, dont l'épissage alternatif peut

conduire à l'exclusion de l'exon 11, synonyme de synthèse d'un récepteur Δ RON tronqué constitutivement activé contribuant à l'invasion cellulaire via la transition épithélio-mésenchymateuse (Ghigna et al., 2005).

Une surexpression de hnRNP H est également observée dans de nombreux glioblastomes et est responsable d'une altération de l'épissage alternatif des gènes *ron* et *ig20*. IG20 est une protéine adaptatrice de la voie de signalisation en aval des récepteurs de mort déclenchant l'apoptose par activation de la caspase-8. Un transcrit alternatif dans lequel l'exon 16 est excisé active la synthèse d'une protéine MADD (protéine activatrice des MAP kinase) aux propriétés anti-apoptotiques suffisant à la survie des cellules (LeFave et al., 2011). De manière intéressante, le mécanisme de régulation de l'épissage de *ron* et *ig20/madd* semble identique : hnRNP H se fixe sur une séquence ESS présente en 5' de l'exon 11 de *ron* et de l'exon 16 de *ig20/madd*, empêchant l'inclusion de ces exons et contribuant ainsi à l'invasion tumoral des glioblastomes (LeFave et al., 2011).

III.1.3 Les anomalies des modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles intervenant après la synthèse protéique modifient la fonction des protéines en affectant leur structure, leur stabilité, leur localisation sub-cellulaire ou encore leur affinité pour un substrat. Ce mode de régulation a été clairement associé à l'oncogenèse, et plusieurs stratégies thérapeutiques cherchent à cibler ces modifications. C'est notamment le cas des inhibiteurs du protéasome ou des inhibiteurs d'histones déacétylases (HDAC).

Les protéines de l'épissage sont, comme tous les polypeptides, sujettes à ces modifications post-traductionnelles et plusieurs exemples attestent de dérégulations de l'épissage causées ou associées à des anomalies de ces modifications au cours de l'oncogenèse.

La phosphorylation des protéines régulatrices est capitale pour la régulation de nombreux processus cellulaires dont l'épissage. Les voies de signalisation contrôlant l'expression et la fonction des kinases sont fréquemment dérégulées lors de l'oncogenèse contribuant à des anomalies de l'épissage pouvant contribuer au développement tumoral. Il s'agit entre autre des voies PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, MEKK/JNK et JAK/STAT.

Ces voies transduisent des signaux intra cellulaires par des réactions de phosphorylation en chaîne activant et inactivant de nombreuses enzymes, permettant le contrôle de la survie, la prolifération, la croissance cellulaire mais aussi l'apoptose ou la réponse aux stimuli extra-cellulaires (Krueger and Srivastava, 2006).

AKT est une kinase clé du contrôle de multiples processus cellulaires dont l'apoptose et compte parmi ses substrats les protéines hnRNP et SR.

Lors de l'épissage du gène de la caspase-9, 2 variants peuvent être produits : un pro-apoptotique et un anti-apoptotique. L'activation de la hnRNP L par AKT oriente l'épissage vers la forme anti-apoptotique synonyme de survie cellulaire (Vu et al., 2013). Toute activation ou expression excessive d'AKT peut entraîner une perte de sensibilité à l'apoptose médiée par la caspase-9.

De manière intéressante, AKT a également été identifiée comme un régulateur de l'activité des SRPK en provoquant leur autophosphorylation (Zhou et al., 2012)(Jang et al., 2009). Cela conduit à leur dissociation d'un complexe de protéines chaperonnes ce qui permet leur translocation nucléaire et la phosphorylation de protéines SR nucléaires.

L'impact des SRPK et CLK dans la survenue de cancers a été largement étudié. Une récente étude démontre que l'inhibition des CLK altère la croissance tumorale et induit l'apoptose de lignées cellulaires par modulation de l'épissage de gènes cibles des CLK. Plusieurs de ces gènes étant impliqués dans la survie cellulaire et la prolifération, ces résultats suggèrent un rôle important de ces kinases dans la croissance tumorale (Araki et al., 2015). Les CLK agissent conjointement aux SRPK lors de la régulation de l'épissage : bien qu'ayant des modes d'actions similaires, leurs fonctions sont complémentaires et antagonistes. Un exemple très parlant de cet antagonisme concerne la régulation de l'épissage du gène codant le facteur de croissance de l'épithélium vasculaire *vegf* : la production du variant pro-angiogénique VEGF₁₆₅ est induite par les SRPK activées par le TNF- α , alors que la production de VEGF_{165b} l'est par l'action des CLK activées par le TGF- β .

L'autre grande voie de signalisation impliquée dans l'épissage est la voie des MAPK, une famille de kinases regroupant les kinases ERK et JNK. Cette cascade également appelée RAS/RAF/MEK/ERK est impliquée dans la réponse au stress osmotique, aux mutagènes et aux cytokines pro-inflammatoires (Chang et al., 2003). Une dérégulation de cette voie ou des SRC kinases conduit à une activation accrue de la kinase SAM68 observée dans les cancers de la prostate, du rein, du sein et colorectaux (Liao et al., 2013). Son activation module l'épissage de plusieurs gènes dont *cd44* en facilitant l'inclusion de l'exon 5. Le variant CD44v5 est associé à la progression tumorale et la formation de métastases (Matter et al., 2002).

L'activation de p38 par cette même voie lors de stress environnementaux conduit à la localisation cytoplasmique de hnRNP A1 phosphorylée par diminution de son affinité pour la transportine responsable

de son transport dans le noyau, modifiant ainsi le profil d'épissage de ces gènes cibles (van der Houven van Oordt et al., 2000).

III.2 Les conséquences des aberrations de l'épissage

III.2.1 L'avantage prolifératif

Il est parfaitement connu qu'un développement tumoral est causé par une prolifération cellulaire incontrôlée résultant entre autres d'une immortalisation, d'un cycle cellulaire dérégulé et d'une apoptose déficiente. La dérégulation de l'épissage alternatif de gènes impliqués dans ces processus participe à l'oncogenèse (Oltan et Bates, 2013).

L'épissage alternatif d'un gène permet dans de nombreux cas la production de protéines aux effets antagonistes. C'est notamment le cas lors de l'apoptose puisque plusieurs gènes codent des protéines pro ou anti-apoptotiques par épissage alternatif.

Un des cas les mieux caractérisés est celui du gène *bcl-x* dont l'ARNm peut coder deux isoformes protéiques BCL- xL et BCL-xS respectivement anti et pro-apoptotiques selon le choix du site 5' utilisé. Un ratio BCL- xL/BCL-xS élevé a été observé dans plusieurs cancers et favorise la survie cellulaire par inhibition de l'apoptose (Bielli et al., 2014).

De la même manière, la rétention d'une portion d'intron lors de l'épissage de la caspase-8 ainsi que l'exclusion d'un exon lors de celui de la caspase-9 conduisent à la synthèse d'isoformes anti-apoptotiques. Ces trois épissages sont régulés par SRSF2 dont l'expression est sous la dépendance du facteur de transcription E2F1 (Merdzhanova et al., 2008). La coopération entre ces deux facteurs régule le ratio de protéines pro et anti-apoptotiques contrôlant ainsi une partie de l'apoptose cellulaire.

Plusieurs récepteurs aux facteurs de croissance ou cytokines sont constitutivement activés au sein de cellules tumorales, activant en permanence les voies de survie cellulaire. Cette activation aberrante peut résulter d'un récepteur anormal codé par un variant alternatif. C'est notamment le cas de l'EGFR dont l'épissage alternatif conduit à la synthèse d'un récepteur tronqué EGFRvIII constitutivement activé qui promeut une perpétuelle prolifération cellulaire.

Dans un même temps, la survie des cellules tumorales est conditionnée par un contrôle du cycle cellulaire et notamment des protéines responsables de l'arrêt du cycle. Un épissage du gène codant p53, le facteur de transcription responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en cas de stress, induit la synthèse d'une

isoforme tronquée en extrémité N-ter qui entre en compétition avec la protéine sauvage et affecte sa fonction (Ghosh et al., 2004).

Un autre processus indispensable à la croissance tumorale est l'angiogenèse, en grande partie médiée par le VEGF. De nombreuses isoformes du VEGF sont produites par épissages alternatifs mutuellement exclusifs (Fig 28). Deux isoformes en particulier ont été largement étudiées : le VEGF₁₆₅ est hautement angiogénique et son homologue VEGF_{165b} est anti-angiogénique. Alors que le ratio VEGF₁₆₅/VEGF_{165b} est d'environ 50:50 dans le tissu sain, ce ratio est largement déséquilibré au profit de VEGF₁₆₅ dans les tissus tumoraux lors de la survenue de cancer du rein, cancers colorectaux et mélanomes (Tayama et al., 2011) (Gammons et al., 2014). L'expression de VEGF₁₆₅ est favorisée par la cytokine TNF- α alors que celle de VEGF_{165b} l'est par le TGF- β (Nowak et al., 2008).

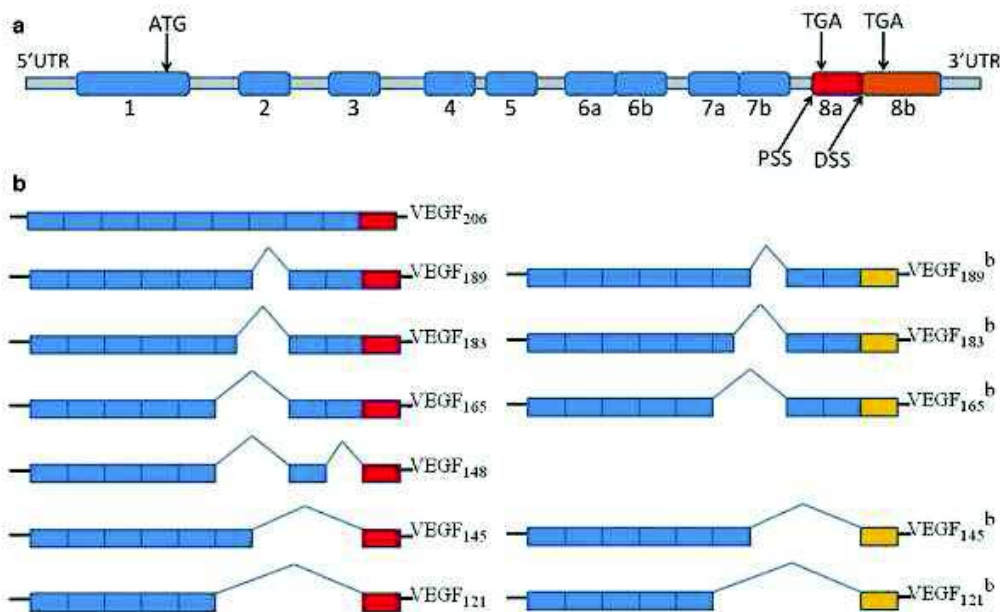


Figure 28: L'épissage du gène codant le VEGF conduit à la synthèse de 2 familles d'isoformes

(a) Le gène vegf est composé de 8 exons. Deux sites donneurs 5' existent au niveau de l'exon 8 un proximal et un distal.

(b) L'utilisation du site proximal conduit à l'incorporation de la portion 5' de l'exon 8 (rouge) et à la synthèse d'une molécule pro-angiogénique alors que l'utilisation d'un site distal incorpore la portion 3' (jaune) et l'isoforme synthétisée est anti-angiogénique. L'incorporation alternative des exons 6 à 9 code des variants de tailles différentes, les nombres indiqués en indice pour chaque isoforme correspondent au nombre d'acides aminés de la protéine.

D'après Biselli-chicote et al, J Cancer Res Clin Oncol 2012

L'angiogenèse permet en plus de la croissance tumorale la formation de métastases et l'invasion tumorale. Ces processus nécessitent de nombreux changements de l'expression génique afin d'entrer dans la

circulation sanguine par intravasation puis de coloniser d'autres tissus après extravasation. Cela implique des modifications phénotypiques importantes dues au processus de transition épithélio-mésenchymateuse. Plusieurs épissages alternatifs interviennent dans ces processus et sont anormalement régulés lors de cancers. C'est notamment le cas du gène codant le récepteur à activité tyrosine kinase Δ RON dont l'activation constitutive aval confère une importante mobilité cellulaire et un pouvoir invasif accru (Ghigna et al., 2005).

Les dérégulations de voies de signalisation cellulaire lors de l'oncogenèse conduisent dans beaucoup de cas à une suractivation de la kinase AKT.

Une des cibles d'AKT est le gène *caspase-9* impliqué dans l'apoptose induite par les chimiothérapies. L'épissage alternatif de ce gène conduit à la synthèse de deux isoformes antagonistes : la protéine sauvage caspase-9a et la protéine tronquée caspase -9b dépourvue des exons 3, 4, 5 et 6 qui codent entre autre le domaine catalytique de la protéine. La caspase -9b peut se lier à APAF-1 via son domaine CARD mais ne déclenche pas l'apoptose, limitant ainsi l'action de la caspase-9 par compétition. La phosphorylation de SRSF1 et de hnRNP L par la voie PI3K/AKT provoque la diminution du ratio caspase-9a/ caspase-9b en favorisant l'exclusion des exons 3 à 6 (Shultz et al., 2010) (Vu et al., 2013).

III.2.2 La résistance aux traitements

Les aberrations de l'épissage, en plus de conférer un avantage prolifératif et invasif aux cellules tumorales, participent à la résistance aux traitements. Des altérations des voies métaboliques conduisent à la non activation de prodrogues ou à leur translocation dans le milieu extra-cellulaire par des mécanismes d'efflux.

La folylpoly- γ -glutamate synthase est une enzyme responsable de la conversion de l'antifolate méthotrexate en composé actif utilisé pour le traitement de nombreux cancers et MAI. Une aberration de l'épissage conduisant à la production d'enzymes inactives a été observée chez des patients atteints de leucémies et est associée à la résistance au MTX (Stark et al., 2009).

Le même phénomène est à l'origine de résistances au 5-fluorouracil, couramment utilisé lors de traitement de cancers colorectaux métastatiques et cancers du sein. La thymidine phosphorylase convertit la prodrogue capecitabine en 5-fluorouracil active. Une localisation anormale des hnRNP H1/H2 et F altère l'épissage du gène codant la thymidine phosphorylase et conduit à une rétention nucléaire et à l'incorporation d'un codon stop précoce conduisant à sa dégradation. En l'absence de cette phosphorylase

cytoplasmique fonctionnelle, le 5-fluorouracile n'est pas synthétisé et le traitement n'est pas actif (Stark et al., 2011).

Ces exemples illustrent les nombreux cas de résistances provoquées par une anomalie de la conversion en composé actif nécessaire à l'efficacité de chimiothérapies. D'autres mécanismes entraînent des résistances, dont la production de molécules antagonistes : le récepteur aux glucocorticoïdes est un facteur de croissance activé par la liaison de glucocorticoïdes tels que la dexaméthasone. Ce récepteur est antagonisé par les nombreuses isoformes tronquées résultant d'un épissage alternatif. Ces variants sont surexprimés dans plusieurs cancers dont les leucémies aiguës lymphoïblastiques, LLC et cancers du poumon (Zhu et al., 2007).

Comme mentionné ci-dessus, un phénomène bien connu de résistance aux traitements chimiques est leur efflux hors de la cellule par des transporteurs tels que la protéine de résistance multidrug 1 (MRP1). Plusieurs anomalies de l'épissage conduisant à la surexpression d'isoformes protéiques de ce transporteur ont été observées dans plusieurs cas de cancers ovariens résistants aux chimiothérapies (He et al., 2004).

Les dérégulations au niveau des facteurs de régulation de l'épissage sont également à l'origine de résistances au traitement bien que les mécanismes ne soient pas clairement élucidés. La mutation du gène *sf3b1* est par exemple observée chez 17% des patients atteints de LLC résistantes à la fludarabine alors qu'elle ne l'est qu'à 5% chez les patients répondeurs (Oscier et al., 2013).

Il a été par ailleurs récemment démontré que les exosomes sécrétés par les cellules cancéreuses modifient le microenvironnement et facilitent l'invasion tumorale (Boyiadzis and Whiteside)(Peinado et al., 2011). La découverte de facteurs d'épissages dans les exosomes d'une lignée cellulaire transformée par l'oncogène H-ras laissent suggérer que le transfert de ces facteurs vers une cellule receveuse pourrait participer à la création de niches pré-métastatiques qui favorisent l'invasion tumorale (Tauro et al., 2013).

III.3 Outils diagnostiques et thérapeutiques

III.3.1 Les variants alternatifs spécifiques des cancers peuvent-ils être utilisés comme outils diagnostiques ?

La découverte de nombreuses isoformes spécifiquement exprimée dans les tissus tumoraux indique que certains de ces variants, à l'échelle de l'ARNm ou de la protéine, pourraient être utilisés comme biomarqueurs permettant le diagnostic précoce de lésions cancéreuses.

L'étude du profil d'épissage par des techniques de RT-PCR haut débit permet de distinguer le tissu ovarien sain du tissu tumoral lors d'un cancer ovarien grâce à 48 épissages alternatifs spécifiques (Klinck et al., 2008).

De la même manière, l'épissage de *hmena* permet un diagnostic précoce du cancer du sein. La protéine hMENA contrôle la réorganisation des filaments d'actine lors de la régulation de l'adhésion et la migration cellulaire. Le variant alternatif hMENA^{11a} est exprimé dans les lésions pré-néoplasiques à haut risque et dans les cellules primaires de cancer du sein au profil non invasif. En revanche, un second variant alternatif hMENAΔv6 a été observé dans les cellules métastatiques en association à un profil invasif. Ces données suggèrent que l'épissage du gène *hmena* pourrait permettre de prédire précocement le phénotype invasif de cellules tumorales (Di Modugno et al., 2012).

Certaines anomalies de l'épissage sont facteurs pronostiques de la survie des patients.

C'est notamment le cas des mutations de *sf3b1* qui sont associées à un mauvais pronostic de survie des patients atteints de LLC (Wang et al., 2011). Au contraire, ces mêmes mutations sont de bon pronostic chez les patients atteints de syndromes myélo-dysplasiques. Les mutations de *u2af1* ont été associées à un mauvais pronostic chez les patients atteints de leucémies chroniques myélomonocytiques. Dans cette même pathologie, les mutations de *srsf2*, *u2af1* et *sf3b1* ne semblent à l'inverse pas impacter la survie des patients.

L'épissage de *klf6* conduit à la synthèse de 3 isoformes alternatives dont l'une est un antagoniste de KLF6 et l'empêche d'exercer son rôle de suppresseur de tumeur, ce qui favorise la prolifération, l'invasion, et donc la croissance de tumeurs ovariennes et pulmonaires (DiFeo et al., 2006)(Hatami et al., 2013). Ce variant KLF6-SV1 est surexprimé dans des lignées de cancer pulmonaire résistantes au cisplatine et pourrait être en partie responsable des échecs thérapeutiques fréquemment observés lors des traitements de cancers du poumon métastatiques (Sangodkar et al., 2009). Cette protéine pourrait, à l'instar de tous les variants alternatifs impliqués dans les résistances au traitement, être utilisée comme biomarqueur prédictif de réponse au traitement.

III.3.2 Le blocage et la reprogrammation de l'épissage

La découverte de l'implication de l'épissage dans l'oncogenèse a conduit au développement de molécules thérapeutiques permettant d'interférer avec l'épissage afin d'empêcher la production de variants alternatifs favorisant l'oncogenèse, la croissance tumorale ou l'invasion.

Les séquences oligonucléotidiques antisens (SOA) sont des petites séquences de 15 à 25 nucléotides spécifiques d'une séquence de pré-ARNm. Leur appariement à un site d'épissage bloque l'accès du spliceosome redirigeant la réaction d'épissage vers un autre site accessible. Ces séquences n'altèrent pas la séquence génomique, sont très stables et peuvent être administrées par des méthodes non invasives et non toxiques (Bauman et al., 2010).

Lorsqu'une mutation crée une séquence d'épissage ou un élément de régulation de l'épissage, le simple fait de bloquer l'accès à ce site permet de restaurer un épissage normal en redirigeant la machinerie vers les séquences correctes. Selon le même principe, la fixation de SOA de part et d'autre d'un exon empêche son inclusion permettant ainsi de forcer l'épissage vers l'isoforme protéique souhaitée. Le résultat peut être la production d'un ARNm mature non-sens qui sera dégradé ou à l'inverse la production d'une protéine fonctionnelle en remplacement d'une protéine tronquée anormale ou non-fonctionnelle (Havens et al., 2013). En revanche, lorsqu'une mutation rend un site d'épissage non-fonctionnel, la simple utilisation de SOA ne suffit pas.

Pour restaurer un épissage correct, des molécules de pré-trans-épissage (PMT) sont utilisées. Elles sont composées d'une SOA associée à un site d'épissage et une copie d'ARN qui sera épissée à la place de l'ARNm endogène. L'objectif est de détourner l'épissage afin d'obtenir l'incorporation de l'exon correct (Puttaraju et al., 1999) (Fig 29). Cette technologie est plus facilement utilisée lors d'anomalies de l'épissage au niveau du premier ou du dernier site d'épissage, mais peut également modifier l'incorporation d'exons internes. Les limites de cette technique résident dans la survenue de trans-épissage non spécifique et dans la difficulté de transfert des molécules dans les noyaux des cellules cibles (Puttaraju et al., 1999).

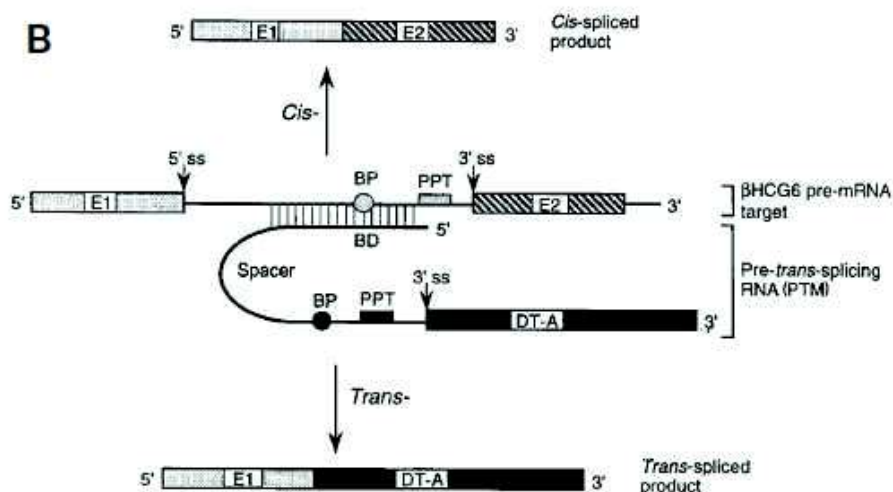


Figure 29: Schéma d'une molécule de pré-trans-épissage

L'épissage naturel du pré-ARNm cible (βHCG6) joint les exons 1 et 2 (E1 et E2) par cis-épissage.

Le PTM s'apparie au niveau du site de branchement (BP) via un domaine de liaison spécifique (BD). L'utilisation du site accepteur 3' du PMT détourne l'épissage de la cible et incorpore l'exon du PMT dans un transcrit trans-épissé.

D'après Puttaraju et al, *Nature Biotech* 1999

Dans le cas de mutations de sites consensus 3', 5' ou site de branchement empêchant la fixation du spliceosome, des modifications des snRNP U1 ou U2 existent pour restaurer l'appariement avec le site muté.

Les premiers résultats probants obtenus avec cette technologie l'ont été dans des modèles précliniques de traitements de maladies génétiques (Havens et al., 2013) dont la β-thalassémie, une pathologie génétique héréditaire caractérisée par une anomalie des globules rouges due à un défaut de synthèse des chaînes d'hémoglobines. Parmi les nombreuses mutations (plus de 200) du gène de la β-globine associées à cette pathologie, de nombreuses provoquent un épissage aberrant empêchant la traduction de la protéine. La mutation IVS2-654(C>T) crée un site d'épissage 5' aberrant et active un site cryptique 3' ce qui conduit à la rétention d'une séquence intronique responsable du blocage de la traduction. L'utilisation d'une SOA spécifique du site d'épissage cryptique 3' restaure un épissage correct et une production de β-globine corrélée à une diminution des symptômes dans un modèle murin pré-clinique (Svasti et al., 2009). L'utilisation de séquences oligo-nucléotidiques anti-sens complémentaires du site donneur 5' conduisant à la production de l'isoforme BCL- xL permet de favoriser l'épissage vers la forme BCL-xS et suffit à induire l'apoptose dans des lignées de cancer de la prostate (mercantante 2002). La même méthode réduit la charge tumorale dans un modèle murin de cancer pulmonaire (Bauman et al., 2010), et sensibilise des lignées tumorales mammaires à la doxorubicine (Mercatante et al., 2002). Une construction de SOA

couplée à un élément régulateur ESE permet de bloquer l'excision de l'exon 11 lors de l'épissage du gène *ron*, et ainsi de limiter la production du récepteur Δ RON impliqué dans la TEM et l'invasion tumorale (Ghigna et al., 2010).

L'utilisation d'une SOA spécifique de la survivine (LY2181308) provoque la dégradation de la protéine, ce qui lève l'inhibition des caspases et sensibilise les cellules à l'apoptose. En association au docétaxel, le LY2181308 a montré une amélioration de la survie de patients atteints de cancer du poumon non à petite cellules dans un essai clinique de phase II démontrant la faisabilité des stratégies thérapeutiques basées sur la redirection de l'épissage.

La reprogrammation de l'épissage n'est pas toujours possible ni suffisante et bloquer l'ensemble du spliceosome peut être une stratégie efficace pour empêcher la production d'un variant pathogène. Les deux inhibiteurs les plus connus sont le pladienolide et la spliceostatine A, deux composés naturels ciblant les sous unités SF3B du snRNP U2. La spliceostatine A empêche la fixation du tri-snRNP sur le pré-ARNm après la fixation de U2 sur le site de branchement bloquant ainsi l'activation du spliceosome et donc la catalyse de l'épissage (Roybal and Jurica, 2010).

Un autre composé, l'amiloride, améliore le traitement de cellules de leucémies myéloïdes chroniques en addition à l'imatinib. L'amiloride altère la phosphorylation de SRSF1 ce qui module l'expression des facteurs régulateurs, aussi bien SR que hnRNP. Ces altérations modifient l'épissage de nombreux gènes dont *bcl-x* et *ron* ce qui contribue à une diminution de la viabilité des cellules leucémiques (Chang et al., 2011).

Des résultats assez similaires ont été obtenus avec la meayamycine qui par inhibition de SF3B1 restaure un ratio MCL-1_L/MCL-1_S favorable à l'apoptose. Cet effet est accentué par l'utilisation conjointe d'un inhibiteur de BCL- xL (Gao and Koide, 2013).

Malgré de probants résultats lors des modèles pré-cliniques, peu d'essais cliniques ont vu le jour pour tester ces composés. Un seul a été l'objet d'un essai clinique: E7101, un dérivé du pladienolide a été testé dans un essai de phase I arrêté en raison de toxicités ophtalmiques non attendues chez 2 patients (Hong et al., 2013). Des mutations du spliceosome ayant été décrites dans la rétinite pigmentaire, l'inhibition de spliceosome pourrait conduire à l'apoptose de cellules photoréceptrices du nerf optique et conduire à la cécité.

Les mécanismes d'action de ces composés restent peu connus, aussi il apparaît nécessaire de poursuivre la caractérisation de ces inhibiteurs afin de les rendre plus spécifiques, moins toxiques et donc plus performants.

III.3.3 Les variants alternatifs peuvent être ciblés à des fins thérapeutiques

D'autres opportunités thérapeutiques sont apparues avec la découverte des épissages alternatifs spécifiques de cancers. La production de nouvelles isoformes protéiques au cours de l'oncogenèse permet le développement de stratégies thérapeutiques ciblées telles que la production d'AcMo.

La surexpression de l'EGFR dans de nombreuses tumeurs a permis le développement d'AcMo anti-EGFR dont le cétuximab et le panituzumab fréquemment utilisés en traitement de cancers colorectaux. Ces AcMo entraînent d'importants effets secondaires en raison de l'expression de l'EGFR par les tissus sains. La découverte d'un récepteur tronqué EGFRvIII constitutivement activé exprimé dans les glioblastomes et les tumeurs mammaires et pancréatique a entraîné le développement d'AcMo spécifiques de ce variant qui suppriment efficacement la prolifération tumorale et l'angiogenèse (Klausz et al., 2011).

Des variants alternatifs du gène *cd44* sont produits par inclusion des exons 6 ou 8 et les protéines codées par ces variants sont fréquemment surexprimées dans les tumeurs épithéliales. La protéine sauvage est un récepteur à l'acide hyaluronique impliqué dans l'adhésion et la migration cellulaire. Plusieurs AcMo ont été développés dans le but de cibler ces variants mais d'importantes toxicités cutanées ont été constatées en raison de l'expression par les kératinocytes de CD44v6 et v8. En revanche, un anticorps dirigé contre une autre isoforme protéique, CD44R1 a montré une efficacité thérapeutique dans un modèle murin sans toxicité cutanée associée observable (Masuko et al., 2012).

RATIONNEL DE LA THESE

L'épissage est un processus biologique capital pour la diversité protéique et est associé à la survenue de cancer : lorsqu'il est dérégulé, l'épissage peut entre autres accentuer la prolifération, le potentiel d'invasion ou encore la résistance au traitement des cellules tumorales.

La protéine CD20, marqueur des lymphocytes B, est une protéine largement ciblée par plusieurs anticorps monoclonaux (AcMo) lors du traitement de pathologies impliquant le lymphocyte B, telles que les lymphomes, les leucémies, et plusieurs maladies auto-immunes.

En 2010 a été découvert au laboratoire un épissage alternatif de *cd20* (D393-CD20) codant une protéine exprimée par les lymphocytes B tumoraux mais absent de cellules saines. L'observation d'une expression de D393-CD20 augmentée chez des patients en rechute après traitement par Rituximab (RTX) a orienté les recherches vers un mécanisme de résistance au traitement impliquant cet épissage.

Mes travaux de thèse, portant sur ce sujet, ont alors eu pour objectifs :

- La caractérisation de l'épissage du gène *cd20* et l'étude des modulations de cette épissage lors de la survenue de pathologies impliquant le lymphocyte B.
- L'étude de l'implication de cet épissage sur la résistance aux AcMo anti-CD20.

Afin de déterminer si l'expression de D393-CD20 est inductrice de résistance au traitement par RTX, des modèles d'acquisition de résistance *in vitro* ont été mis en place. Plusieurs lignées B issues de lymphome de Burkitt ou transformées par l'EBV ont été utilisées, de même que plusieurs AcMo anti-CD20 aux mécanismes d'action différents.

En parallèle de ces travaux, des bandes supplémentaires à celles correspondant aux protéines D393- et WT-CD20 ont été observées par western blotting anti-CD20 pour des prélèvements de patients atteints de leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) ou de lymphomes du manteau.

Pour déterminer si les bandes additionnelles observées par WB sont le produit d'épissage alternatif de *cd20*, les produits de PCR amplifiés par une PCR spécifique des extrémités de la région codante ont été purifiés, clonés puis séquencés. Plusieurs séquences homologues à *cd20* ayant été détectées, une recherche de sites d'épissages potentiels a été réalisée grâce à des logiciels de prédiction.

Suite à l'identification de quatre variants alternatifs en plus de D393-CD20, le profil d'épissage de patients atteints de pathologies diverses impliquant le lymphocyte B a été réalisé. Des prélèvements de patients atteints de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), de lymphomes, de polyarthrite rhumatoïde

(PR), de pemphigus vulgaire (PV) ou lors d'infection virale par le virus Epstein-Barr (EBV) ont notamment été analysés.

Les données obtenues suggèrent une dérégulation générale de l'épissage associée aux pathologies du lymphocyte B, résultant possiblement d'une activation ou d'une prolifération. Une dérégulation plus spécifique induirait également la production de D393-CD20 lors de la survenue de lymphomes se développant à partir de cellules issues des centres germinatifs.

L'identification de la protéine D393-CD20 spécifiquement associée à l'oncogenèse nous a conduits à étudier la possibilité de développer une stratégie thérapeutique ciblant ce variant. L'identification de l'existence de lymphocytes TCD4 spécifiques de D393- rend possible le développement d'une stratégie d'immunothérapie ciblant D393-CD20, ce qui permettrait une élimination ciblée des lymphocytes B tumoraux en limitant l'altération de cellules saines.

RÉSULTATS

DONNÉES PUBLIÉES

Identification of new CD20 alternative splice variants differentially expressed in hematological malignancies

La découverte de l'existence d'un épissage alternatif de *cd20* conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée exclusivement exprimée par les lymphocytes B tumoraux et transformés par l'EBV a conduit à l'étude de la caractérisation de cette protéine D393-CD20 et de son expression au sein de diverses hémopathies B.

C'est au cours de ces travaux qu'ont été observés, par WB anti-CD20 de prélèvements de patients atteints de lymphomes B, des bandes ne correspondant ni à la protéine sauvage WT-CD20 ni à la protéine tronquée D393-CD20. L'hypothèse de l'existence d'autres épissages alternatifs a alors été investiguée.

L'identification de 4 nouvelles séquences homologues à *cd20* a été réalisée grâce au séquençage de produits de PCR amplifiés par une RT-PCR spécifique de la séquence codante de *cd20*.

L'alignement des séquences, et l'identification de sites cryptiques et canoniques compatibles avec les séquences *cd20* tronquées identifiées, ont contribué à l'identification de ces séquences comme des produits d'un épissage alternatif de *cd20*.

L'analyse de prélèvements de patients atteints de diverses pathologies B a montré l'existence de différentes modulations de l'épissage. Les 5 variants alternatifs ne sont en effet pas identiquement exprimés : si D657- et D618-CD20 sont observés dans la majorité des pathologies B étudiées, D393-CD20 ne l'est que dans certains lymphomes ou après transformation par le virus EBV, suggérant une dérégulation spécifique de l'épissage durant l'oncogenèse.

Identification of new CD20 alternative splice variants differentially expressed in hematological malignancies

Clémentine Gamonet¹, Elodie Bole-Richard ¹, Aurélia Delherme¹, François Aubin², Eric Toussiro^{2,3}, Francine Garnache-Ottou^{1,2}, Yann Godet^{1,2}, Loïc Ysbaert⁴, Olivier Tournilhac⁵, Van Den Neste Eric⁶, Fabrice Larosa^{1,7}, Eric Deconinck^{1,2,7}, Philippe Saas^{1,2}, Christophe Borg^{1,2}, Marina Deschamps¹ & Christophe Ferrand¹

¹ INSERM UMR1098, Établissement Français du Sang Bourgogne Franche Comté, Université de Franche-Comté, SFR FED4234, 25020 Besançon, France

² Université de Franche Comté, EA3181 et Service de Dermatologie, CHU de Besançon. France.

³ Department of Rheumatology, University Teaching Hospital, CHRU, 25000 Besançon, France; EA 4266, Université de Franche-Comté, Besançon, France.

⁴ Inserm U1037, Université Toulouse 3-ERL CNRS, CHU Purpan, Toulouse, France

⁵ Hématologie Clinique, CHU Estaing, 1 Place Lucie Aubrac, 63003 Clermont-Ferrand Cedex 1, France.

⁶ Institut Roi Albert II Cliniques Universitaires St-Luc, Av Hippocrate, 10 - 1200 Bruxelles - Belgique

⁷ CHU Jean Minjoz, Hematology Department, 25020 Besançon, France

Version finale avant soumission

Supported by the "Ligue Nationale contre le Cancer" Grant 2011, Fondation de France Grant 2011

Authorship

CG executed all experiments, as cell cultures, cytometry, western blotting, molecular biology and wrote the original draft of the manuscript. AD performed all PCR, RTPCR and RTqPCR set-up. EBR help on cells transfection and retroviral transduction. LY, OT, EVDN FL, ED, FA, ET provided biological samples from their respective clinical trials or clinical experience. FGO, PT, PS, CB, contributed to improve the manuscript and gave final approval. CF & MD initiated and designed the study, participated in every step of the study, managed the whole project and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Text: ____ words Abstract: 254 words

Corresponding author:

Christophe FERRAND, PhD

Laboratoire de Thérapeutique Immuno-Moléculaire et cellulaire des cancers, INSERM UMR1098

Etablissement Français du Sang – Bourgogne / Franche-Comté

8, rue du Docteur Jean-François-Xavier Girod, 25020 Besançon cedex

Tel: +33-3-81615615 Fax: +33-3-81615800

E-mail: christophe.ferrand@efs.sante.fr

Abstract

Background. CD20 is a B-cell lineage-specific marker expressed by normal and leukemic B cells targeted by several anti-CD20 antibody immunotherapies. We have previously showed that a CD20-spliced-mRNA protein (D393-CD20) is expressed at various levels in leukemic B cells or lymphoma B cells, but not in resting sorted B cells from peripheral blood of healthy donors.

Results. Western Blot (WB) analysis of B malignancy primary samples enables to detect additional CD20 signals. Deep molecular PCR analysis allows us to detect 4 new sequences, corresponding to in frame CD20 splice variants (D657-CD20, D618-CD20, D480-CD20, and D177-CD20) matching the length size of WB signals. We demonstrated that cell-spliceosome machinery is able to process ex-vivo D480-, D657- and D618-CD20 transcript variants by involving canonical, associated with cryptic splice sites.

With specific and quantitative RTqPCR assays, we showed that these different CD20 splice variants are differentially expressed in B malignancies. Moreover, EBV transformation modified CD20 splicing profile and increased mainly D393-CD20 variant transcripts. Finally, investigation of 3 cohorts of CLL patients shown that total CD20 splice is higher in stage B & C compared to routinely collected CLL samples or relapsed / refractory CLL stage A, B or C.

Conclusion. Discovery of new alternative CD20 transcript variants, involvement of some specific CD20 variants in EBV transformation, association with oncogenesis rather than non-oncogenic B diseases, differential expression in B malignancies, correlation with stage of progress of CLL and with some predictive CLL markers make them as interesting molecular indicators that should be investigated in further studies

Introduction

CD20 protein was highlighted in 1980 as a B lymphocyte specific cell-surface antigen expressed on all stages of B cell ontogenesis, except early pro-B cells and plasma cells [1]. Despite no identified ligands, CD20 functions were largely investigated and studies confer it a role in cell differentiation [2] and calcium flux pathways [3].

The anchorage within the membrane of the 33 kDa protein makes it as a good candidate to be an ion channel [3], especially when organized in tetramers [4]. Moreover, the presence of 2 extracellular loops allows for targeting by monoclonal antibodies (MoAb) inducing thus B-cell depletion. The most well-known MoAb is the Rituximab (RTX) that has greatly improve B-cell malignancies treatment [5], in association or not with Chemotherapy [6]. Since RTX, numerous others MoAb (as for example Obinutuzumab, Ofatumumab...) were subsequently developed in order to improve B-cell depletion but also to treat RTX resistance or escape to treatment [7]

CD20 is encoded by a gene belonging to MS4A family located into Chromosome 11. Whereas multiple transcription initiation sites were identified, the translated region of this gene is located between the 3rd (193rd nucleotide) and 8th exon (216th nucleotide), resulting in a coding sequence of 894bp distributed into 6 exons [8]. Moreover, alternative splicing of CD20 gene has been highlighted, in the 5' untranslated region resulting in transcription of 3 different alternative CD20 mRNAs encoding the same protein in human B lymphocytes.

Alternative splicing remain a key process of pre-RNA maturation, which allows to increase protein translation and thus phenotype diversity [9]. Different patterns of splicing have been described, depending on 2 families of regulatory proteins, as Serin-Rich (SR) and hnRNP proteins (for review, see [10]).

Aberrant splicing, caused by mutations in splice site sequences within cancer related genes or in genes encoding splicing regulation proteins [11], has a preponderant role in tumor establishment, progression, and response to treatment [12]. Abnormal splicing mechanisms produced numerous cancer-associated alternatively spliced variants that could promote angiogenesis, invasion and drug resistance, conferring a more aggressive tumoral profile [13]. These alternative variants are differentially expressed in tumors [14] and thus may be used as diagnostic tool and prognosis marker [15]. Moreover, emerging new treatments can target new isoform proteins encoded from aberrant splicing [16] or modify splice site selection by oligonucleotides approaches to prevent abnormal splice [17].

In onco-hematology, numerous spliceosome gene mutations have been identified in CLL, myelodysplastic syndromes (MDS) or lymphomas. SF3B1, U2AF1 and SRSF2 are among the most well-known [18-20]. Alternative splicing occurring in B cells could also be modified by EBV

infection: BMLF1 viral protein modify STAT1 splicing after binding with the spliceosome component SRp20 [21], and thus may have an influence on immortalization of target B-cells.

We [22] and others [23] have identified novel alternative CD20 transcripts, fully matching the MS4A1 sequence, excepted of 501bp (from nucleotide 111 to 612, starting +1 of ATG codon) flanking by cryptic acceptor (AS) and donor (DS) splice sites. The resulting in-frame cDNA sequence encode for a truncated CD20 protein, called D393-CD20 (previously named Δ CD20 [22]) missing the major part of transmembrane and extracellular domains, including the RTX epitope. Interestingly this protein has been observed in malignant or EBV transformed B cell but not in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), Bone Marrow-derived Mast Cell (BMMC) or plasmocytes from healthy donor.

Additional investigations on D393-CD20 protein expression by western blotting on different hematologic samples allow us to detect extra-signals that were investigated in this present work, extended to auto-immune or EBV-infected samples. Molecular analysis led to describe and characterize others news alternative CD20 transcripts differentially expressed in hematologic malignancies.

Results

Additional band signal is detected by c-term CD20 western blotting on blood samples collected from patients with hematologic malignancies

As expected, western blot (WB) analysis using a carboxy terminus (C-term) CD20 antibody, of circulating PBMC from patients with B-cell hematologic malignancies (CLL and NHL), CBL, B-Cell lines or healthy donors reveals immunoreactive bands at 35kD corresponding to the full length CD20 protein, indicating the presence of B lymphocyte in each sample (Figure 1). As previously described, a band at 20kD, encoded by the CD20 alternative transcript D393-CD20 [22] was detected on CLL (5/5) and NHL samples (3/3), as well as on leukemic B-Cell lines (3/3). In contrast, the 3 CBL (without tumoral circulating B cells, as detected by B cell clonality analysis) and the 4 healthy donor's samples are all negative for the 20kDa.

We detected clearly an unexpected additional immuno-reactive band at approximately 27kD in all CLL and NHL samples. This band was also detected on MCL samples (data not shown). Surprisingly, this band was not detected on the 3 B-cell lines.

Moreover, WB enables to detect supplementary signal close the 35kD (full length CD20 protein) or the 20kD (D393-CD20) bands.

CD20 Homologous but also truncated nucleotide sequences are identified in B-Cell lines

After RT-PCR of the full-length CD20 (fl-CD20) coding sequence, agarose gel electrophoresis allowed us to detected the two mainly expected products at 894bp and 393bp PCR corresponding respectively to wt- and D393-CD20 cDNA sequences. None of these visible amplified DNA fragments matched to products that may correspond to sequence encoding the 27kD or other additional signals.

All fl-CD20 PCR fragments comprising between 894bp and 100bp, excluding the major 393bp PCR product, were gel purified, TA cloned, amplified and Sanger sequenced. Sequencing of more than 150 individual bacterial colonies led to identify, in addition to D393-CD20 sequence, 4 new different nucleotide sequences partially homologous to the wt-CD20 reference nucleotide sequence published in Genbank (NM152866.2) (Supplementary figure S4 & S5). The 4 sequences were named according to their length: D657-CD20, D618-CD20, D480-CD20 and D177-CD20 have a length of 657bp, 618bp, 480bp and 177bp resulting of a 237bp, 276bp, 414bp and 717bp deletion, respectively.

All newly identified sequences code for in frame CD20-transcript variants resulting of MS4A1 alternative splicing

Bioedit© alignments revealed that all new sequences match perfectly at the 5' and 3' region with the conservation of start and stop codon of the wt-CD20, whereas we detected a missing central area, generating a new sequence junction (Figure 2a & 2b). An advanced analysis of the fusion sequences allows us to highlight an alternative splicing phenomenon bringing in combination of cryptic (Cr) or canonic (Ca) splicing Donor (DS) or Acceptor (AS) sites. Five splicing sites correspond to Ca, and 3 to Cr, either Donor or Acceptor. Identification of the 3 Cr-DS or Cr-AS was confirm using online splicing prediction tools as *SplicePort Prediction* [24] and *ASSP Prediction* [25] (Fig 2b).

Based on [26], 2 patterns of splicing involving both canonic DS and AS are identified as exon or multiple exon skipping for D480- and D657-CD20 respectively. One splicing pattern involving cryptic and canonic sites is qualified as alternative 3' splice site (D618-CD20) and lastly 2 patterns (including known D393-CD20) concern alternative 5' and 3' cryptic splice sites. Characteristics of splice variant transcripts are reported in Figure 2b and summarized in Table 1

All sequences are in frame and DNA translation generated new amino acid fusion sequences (Figure 2c).

Design of RT-PCR and RT-qPCR molecular tools allows for specific detection and quantification of all newly identified spliced CD20 sequences

In order to study presence of transcripts and their level of expression, we designed RT-PCR and RT-qPCR assays (Supplementary figure S3). As show in Figure 3a, fl-CD20 PCR allowed to amplify all CD20 alternative transcripts from either genomic DNA or cDNA extracted or synthesized from PG13 transfected cell lines. Moreover, all transcripts-specific RT-PCR allowed to detect specifically their respective CD20 alternative transcripts, without cross-reactivity with the others as shown when target used is gDNA (Figure 3b). Interestingly, D393spe-PCR amplified cDNA synthesized from ARN extracted from wt-, D657-, D480, D393-CD20 cell lines. Positive signals detected with D177spe-PCR from all cell lines mean that all constructs are able to produce the D177-CD20 transcript.

Finally, RT-qPCR assays allow also specific detection without cross reactivity (data not shown) from a CD20 transcripts variant to another. Reproducibility of all the assays was assessed by 7 independent experiments on 4 different B cell lines Raji, Mec, Rec and SKW6.1 (Figure 3c). Standard deviations of each RTqPCR for all 4 cell lines were [min – Max]: [0.52 – 0.8]; [0.05 – 0.2]; [0.1-0.52]; [0.001 – 0.39] [0.28 -0.62] respectively for wt-, D657-, D618-, D480-, D393- and D177-

CD20 PCR. Interestingly, we noted that B-cell lines resulting from different B cell malignancies present specific CD20 splicing profiles.

Reintroduction of intron sequences within coding CD20 sequence confirm the involvement of Ca-DS or -AS splicing sites in D657-, D618 and D480-CD20 splice variants transcription.

In order to confirm that canonical, associated with cryptic splicing sites, may be involved in CD20 variant transcription, as hypothesized from sequencing identification, some introns (3, 5, 6) sequences were used to generate artificial constructs carrying intron sequences within the wt-CD20 coding sequence (Figure 4a).

D393- and D177-CD20 are produced by all 3 constructs independently of the presence of canonic sites, since the splicing involves only cryptic DS and AS. However, reintroduction of int5 produces D618-CD20 transcript. Dual reintroduction of int3 and 6 produce D480-CD20, whereas presence of int5 and 6 allows to express D657- and D618-CD20 mRNA (Figure 4b).

All these results confirm that cell-spliceosome machinery is able to process ex-vivo D480-, D657- and D618-CD20 transcripts variant by involving canonical splice sites, associated with cryptic sites.

EBV transformation modifies CD20 splicing profile and increases mainly D393-CD20 variant transcripts

Among the 4 B-cell lines, CD20 splicing quantification showed a higher and significant increase of D393-CD20 variants in the EBV transformed cell line SKW6.4. For this reason, the impact of EBV infection or transformation on CD20 splicing was investigated within different kind of EBV-samples.

Six EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines (BLCL) have been derived from 6 healthy donors PBMC. As shown in Figure 5a, total CD20 splicing is significantly increased in BLCL (3.4 time, $p < 0.01$) compared to their respective PBMCs. Separate CD20 splice variants analysis revealed that this increase implies D657- and D618-CD20, but mainly and statistically significantly D393-CD20 (0.01 to 1.10 $p < 0.001$). D393-CD20 represent the major part (76.5%) of the total CD20 splice increased compared to both D657- and D618-CD20 (23.4%).

In contrast, total CD20 splice doesn't range significantly neither for IMN samples compare to healthy PBMC (figure 5b) nor for EBV reactivated samples after allograft (figure 5c), although we noted an increase of D657 and D618-CD20 splicing. Interestingly, D393-CD20 transcripts are not increased in these EBV infected cases, compare to EBV transformed cell lines.

CD20 splice variant profile expression can discriminate B cell malignancies

According to the different CD20 variant profiles in different B-cells lines Raji, Mec, Rec and SKW6.1 (figure 3c) derived from different hematologic diseases (respectively CLL, Burkitt's lymphoma, Mantle cell lymphoma and B-lymphoblastoid), we investigated by RT-qPCR the expression of the different CD20 variants transcripts in different B cell malignancies. Percentage of total alternative CD20-transcripts from all 4 B-cells lines but also from primary cells of FL and DLBCL are significantly different from healthy PBMC ($p=0.01$ and <0.01 respectively) (figure 6a).

When analyzed separately, D657 is mainly involved in the increase of total CD20 splicing (81.93%) whereas D618 and D393 represent respectively 7.04% 10.66% of the increase in FL. In contrast in DLBCL, the increase is mostly due to D657-CD20 (43.87%), but also to D393-CD20 (40.26%), whereas D618 participates to only 15.72% of the increase (figure 6b).

Relevance of alternative CD20 splice variants quantification within 3 different CLL-patient cohorts

We took advantage of the availability of CLL samples from 3 different cohorts of patients: daily collected CLL patient samples (50.8% - 49.1% stages A – B/C respectively) for routine diagnosis analysis (CHU Toulouse, France, $n=70$), CD19 positive B-cells purified from elderly patients with CLL stages B & C at diagnosis (CLL2007-SA trial[27], $n=54$, 65.5% & 34.5% B and C stages respectively, $> 65y/o$ – media 71.2), or from relapsed stages A, B or C (mainly stages B & C for 88.7%) with active disease patients (CLL01 BOMP clinical trial, $n=70$). Considering the percentage in CLL2007-SA, the median of total CD20 splicing ($1.26\% \pm 1.23$) is significantly higher than in routine CLL ($0.65\% \pm 0.5$, $p < 0.02$) or BOMP $0.76\% \pm 1.02$, $p < 0.001$) (figure 7a). The increase is mainly due to the D657- and D618-CD20 and for a lesser part to D393-CD20 (figure 7b).

We finally study if there is relationship of total CD20 splicing with several principal relevant markers available and useful for CLL characterization, as mutational status (SF3B1, Notch, TP53 or IgVH) or biological parameters (CD38 cell surface expression, ZAP70 or $\beta 2$ microglobulin level) as well as response to treatment. We divided biological samples of each CLL cohorts in 3 equal parts corresponding to patients with high, medium or low amount of total CD20 splice variants (figure 8a b c).

The part with patients expressing the highest splice level corresponds with the highest frequencies of *sf3b1* mutations and the lowest frequencies of *notch1* mutations. No correlation is observed with the IgHV or TP53 mutational status. Interestingly, a correlation with response

treatment appear: the group with the most splice level is the one with the best response rate (data not shown).

Discussion

We have previously identified a novel alternative CD20 transcript, fully matching the MS4A1 sequence, except a 501bp region flanked by cryptic acceptor (AS) and donor (DS) splice sites [1]. The resulting in-frame cDNA sequence encodes a truncated CD20 protein revealed by a C-term CD20 polyclonal antibody. Interestingly this protein has been observed in malignant or EBV transformed B cell but not in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), Bone Marrow-derived Mast Cell (BMMC) or plasmocytes from healthy donor.

Detection of unexpected additional western blot (WB) signals, with an anti-carboxy terminus CD20 antibody, led us to conduct a deep molecular analysis in order to characterize potential transcripts that could match the protein signal. Starting from nucleic acid material extracted from B cell lines or interestingly from primary samples of patients carrying B cell hematologic diseases such as CLL, MCL or DLBCL, we were able to identify and characterized more precisely, in addition to the D393-CD20, 4 additional CD20 splice variants. Two of these variants are the result of exon skipping (D657- and D480-CD20) and the 2 others result from the use of alternative splice sites: canonical donor site and cryptic acceptor site for D618-CD20 and 2 cryptic splice sites for D177-CD20, as previously well described mechanisms [10]. In addition to the D393-CD20 transcript, Small et al [23] have already detected the D618- and D657-CD20 transcripts only in lymphoblastoid B cell lines. In this present work, we detected the expression of these 2 transcripts in primary samples of human B cell diseases and reported for the first time two novel additional D480- and D177-CD20 transcripts. We also demonstrated ex-vivo the involvement of canonical associated with cryptic splice-sites which produce these transcripts. Based on the variants length, the proteins potentially encoded by D393, D618- , D657- and D480-CD20 could match to the immunoreactive bands observed by WB.

We designed quantitative molecular tools to study variant CD20 transcripts expression in different B autoimmune or malignant B diseases. In auto-immune diseases (RA and Pemphigus), we never detected the D393-CD20 transcripts [28, 29] while it was overexpressed in some B-cell lymphomas. This observation strengthens the hypothesis of a CD20 splicing deregulation leading to D393-CD20 production during oncogenesis, and may be an interesting molecular marker of B malignancies. Low level detection of D657- and D618-CD20 could results from splicing deregulation associated with B-cell increased proliferation or activation [30] as it occurs during cancer but also auto-immune disease and virus infection [31]. Moreover, spliced-CD20 protein may also alters BCR/CD20 cell signaling in the tumor cells, that can also contribute to rituximab

resistance or other treatment targeting CD20 cell surface protein [30]. We have already demonstrated by CD20-immuno-precipitation (IP) using antibody targeting extra-cellular domain, followed by WB revealed using the C-terminus CD20 specific antibody, that D393-CD20 protein is associated with WT-CD20. According to the predictive size of potentials others proteins, they could also be associated with WT-CD20 since the sizes match to additional bands observed in WB. (Supplementary figure S6). Subcellular divisions of transfected cells with D393-CD20 coding sequence revealed that the variant protein is mainly found in the membrane fraction, although main part of the transmembrane sequence coding sequence is missing. This strongly suggest an association between WT-CD20 and D393-CD20 protein. Finally, lipid raft isolation showed the presence of D393-CD20 and WT-CD20 already within this lipid rafts. All of these observations hypothesize a regulation of CD20-splice variants proteins of BCR signalization or calcium flux, putative functions of CD20 protein [31].

The investigation of B-Cell immortalization (DBCL) after EBV virus infection revealed a significantly higher increase of total CD20 splice variants, mainly due to the D393-CD20 transcripts. Interestingly, CD20 splicing has not been increase statistically in IMN or in reactivated EBV samples, although we noted an increase of D618- and D657- but not D393-CD20 transcripts, contrasting with DBCL. These results suggested a CD20 splice modulation caused by oncogenesis process rather than viral infection itself. It is known that SM (Mta, EB2, BMLF1) protein, an EBV oncogenic nuclear protein bounded to RNA influences RNA stability, splicing, nuclear export and translation. This contribute to facilitate virus replication and persistence in-vivo [32]. It has been shown that SM protein is associated with 3 SR proteins SF2/ASF (SRSF1), 9G8 (SRSF7) and SRp20 (SRSF3) and antagonize SRSF3[33]. Thus SM EBV protein may be an actor that regulates CD20 cellular gene expression at the level of alternative splicing.

If a low level of CD20 alternative splicing is detected in CBCL, LZM, MM and some CLL samples, a significant higher amount is observed concerning FL, HG-NHL and transformed B-cells lines. These increases result from a higher proportion of D393-, D618- and D657-CD20 for FL and HG-NHL but only from D393-CD20 for B-EBV transformed B-cells. It appear that CD20 splicing modulation occur mainly during post germinal center (GC) lymphomas (FL, Burkitt and DLBCL). Into GC, BCR maturation requires AID intervention in order to introduce mismatches which are then repaired by mismatch repair complex. This process is obviously known to be responsible of genetic abnormalities involved in oncogenesis, but could also disturb splicing. Indeed it has been reported interactions and associations between AID and splicing factors snRNPs as U2AF65 [34], PTB2 or SRSF2 [35]. This may explain in part that AID activation pathway could lead to deregulation of splicing factors that disturb CD20 splicing, thus producing alternative CD20 variants expression in post GC lymphomas.

Modification of splicing generating in frame mRNA, potentially translated into new proteins, could participate in the tumoral edition by generating neo-epitopes which could be targeted in anti-tumoral vaccinal strategies [36, 37]. Concerning CD20 alternative splice variants, we have demonstrated that the 20mer D393-CD20 peptide spanning the splicing site might be targeted by the immune system and we have shown that D393-CD20-specific CD4 Th1 clones could directly recognize malignant B cell lines and kill autologous lymphoma B cells indicating that D393-CD20-derived epitopes are naturally processed and presented on tumor cells [38]. Additional CD20 alternative splice variants may also be new tumoral antigens that could be targeted by a redirected immune system, as transgenic TCR.

Another interest of studying the splicing pattern is to identify new biological markers to better classified malignancies, to predict the overcome of disease or to monitor treatment [12]. We took advantage of the availability of three cohorts of CLL patients in order to define if CD20 splicing molecular quantification may be a useful tools to define B malignancies. CLL disease is a good model disease, because it is known that the mutations of SF3B1, a critical component of the splicing machinery, are associated with progression and fludarabine-refractoriness [39]. Correlation of total alternative CD20 transcripts proportion with the incidence of B & C CLL stages could make of this marker an indicator of the stage of disease progression, useful for CLL stratification.

Interestingly, we were able to highlight a positive correlation between the CD20 alternative transcript amount and the presence of SF3B1 mutations in the BOMP clinical trial. This observation supports the evidence that altered pre-mRNA splicing has been detected in CLL cases with SF3B1 mutations [18]. Contrary to what is described in the literature, mutations of SF3B1 are here associated with a better response rate: the SF3B1 mutational profile is a relevant biological marker at diagnosis, but BOMP cohort includes relapsed patients, and probably the effect of the different treatments previously administrated reduce the relevance of SF3B1 mutations as biological marker.

In conclusion, the discovery of new alternative CD20 transcript variants involved for some of them in EBV transformation and oncogenesis, as well as their differential expression in B malignancies correlated with some predictive CLL markers indicate that CD20 splicing modulations could be an interesting molecular indicator that should be investigated in further studies.

Materials and methods

Biological samples, patients and cell lines

Master cell banks of human and mouse cell lines were prepared from cells the DSMZ or ATCC cell banks. Working Cell bank were then established and cells were cultures in RPMI 1640 or DMEM with 10% fetal calf serum.

Peripheral blood samples were selected from hematologic B-cell diseases [Chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), follicular lymphoma (FL), mantle-cell lymphoma (MCL), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), and cutaneous B-cell lymphoma (CBCL), multiple myeloma (MM), Marginal Zone lymphoma (MZL), non-Hodgkin lymphoma (NHL)] or autoimmune disease [Rheumatoid arthritis (AR)], as well as Infectious Mononucleosis (IMN). In addition, EBV-reactivated samples collected from renal, lung or hematopoietic allograft were screened. Samples were collected from diagnostic assessment, clinical trial, or from a blood bank for the healthy PBMCs.

EBV-derived B lymphoblastoid cell lines (BLCL) have been established from healthy donors PBMC. PBMC were transformed with EBV supernatant in X-vivo medium with Cyclosporine A at 1µg/ml 2 days and maintained in culture for at least 10 days, until immortalized B-cell line was obtained.

CLL samples were collected from 3 different cohorts of patients: PBMC collected at diagnosis for routine analysis (CHU Toulouse, France) and CD19+ immunomagnetic purified B-cells (Whole human Blood CD19 MicroBeads, Miltenyi Biotec) of CLL patient's samples, stage B & C included within the CLL2007-SA (for elderly patients older than 65 years) and patient's included within ICLL01 BOMP clinical trial (relapsed or refractory CLL stages A, B or C with active disease or after 1 to 3 previous lines including at least one line with fludarabine), both initiated by GOELAMS / GCFLLC-MW intergroup.

Written informed consent was obtained according to institutional protocols.

Western Blotting

Cells were lysed in sample buffer (2% SDS in 125mM Tris HCl, pH 6.8). Equivalent proteins amount, extracted from 1.10E7 to 8.10E7 cells, were separated by electrophoresis on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred to PDVF membranes (GE Healthcare).

Blots were then blocked for 1 hour in 6% milk before incubation with specific antibodies as follows: rabbit anti-human CD20 specific to the COOH-terminal region [22] (Thermo Scientific)

and rabbit anti-Actin (#8457L, Cell signaling). Blotted proteins were detected and quantified on a bioluminescence imager and BIO-1D advanced software (Vilber-Lourmat) after incubating blots with a horseradish peroxidase-conjugated appropriate secondary antibody (Beckman Coulter).

Molecular studies: RNA isolation, reverse-transcription, Cloning, real-time quantification and Sanger cycle sequencing

Total RNAs were extracted using the RNeasy Total RNA Isolation kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), following manufacturer protocols. One µg of total RNA was used as template for cDNA synthesis performed using high capacity RNA to cDNA kit (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France).

Genomic DNA was extracted using DNeasy blood or tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), or salting out method. Briefly, cells were lysed by TES buffer supplemented by Sodium Dodecyl Sulfate 20% and Proteinase K 0.5mg/ml. Protein were then precipitated by saturated NaCl solution, centrifuged and DNA was then precipitated using ethanol.

Qualitative RT-PCR were performed using MyTaq DNA polymerase ready-to-use master mix (Bioline, France) and specific primers (spe). PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis following by UV detection. When useful, PCR products were gel purified, cloned within pCR® 2.1-TOPO® TA vector (life technologies) and Sanger forward and reverse sequenced using M13 primers. Purified sequencing products were run on an ABI-3130 DNA analyzer, analyzed using sequencing analysis v5.2 software (Applied Biosystems). Sequences were aligned against WT-CD20 coding sequence using the Bioedit v7.1 software.

Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) were performed using splice variants specific primers and bi-fluorescence probes. cDNA were amplified with TaqMan Universal Master Mix with UNG (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) using a standard 2-steps amplification program (10 sec at 95° and 1 min at 60°).

CD20 variant transcripts copy number was assess by RTqPCR against a plasmid dilution curve. All PCR samples were normalized by ABL copy number. Proportion of each CD20 transcript variants is calculated against all CD20 isoforms.

PCR conditions, size of PCR products, name and sequence of primers are described in Supplementary table S1. Schematic localizations of all PCR primers and bi-fluorescent probes are provided in figure S3.

Cells transfection and packaging cell line production

wtCD20 coding sequence was first cloned into pcDNA3.1-GFP mammalian expression vector. To restore canonical splice sites within the cDNA coding sequence, intron 5 (int5) was previously reintroduced into the pcDNA3.1-GFP-wtCD20 to generate pcDNA3.1-GFP-int5-CD20 producing theoretically D618-CD20 transcripts. Intron 6 (int6) was then inserted into the pcDNA3.1-GFP-int5-CD20 in order to generate pcDNA3.1-GFP-int5 & 6-CD20 expressing D657-CD20 transcripts. Finally, reintroduction of introns 3 (int3) and 6 within the wt-CD20 sequence allowed to express D480-CD20 mRNA from pcDNA3.1-GFP-int3 & 6-CD20 vector. All of these vectors were amplified into JM105 bacteria. HT1080 cell line was then transfected by these vectors using lipofectamine transfection kit (Life technologies) to produce transient expressing cell lines.

In addition to the D393-CD20 packaging cell line, previously produced, wtCD20, D657-CD20 and D618-CD20 coding sequences were inserted in the retroviral pBABE-GFP vector (Addgene, United Kingdom). PG13 packaging cell line was transfected by the pBABE-GFP-wtCD20, pBABE-GFP-D657-CD20 and pBABE-GFP-D618-CD20 vectors using lipofectamine transfection kit (Life technologies). Supernatant were then collected at 48h, 72h and 96h to produce HT1080 transduced cells, cultured and selected in puromycin containing medium. Percentage of stably transduced cells was controlled by assessing GFP expression by flow cytometry.

Splice site prediction and statistic computational analysis

Splicing site were identified using online splice site prediction tools, as: SpliceProt prediction[24] (<http://www.spliceport.org>) or ASSP Prediction [25] (<http://wangcomputing.com/assp/>).

Statistical analysis was performed using KHi2 test.

Figures

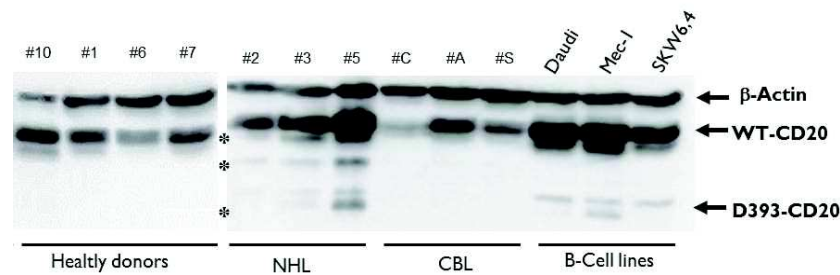


Figure 1 : Additional band signal is detected by c-term CD20 western blotting on blood samples collected from patients with hematologic malignancies

Western Blotting on different samples collected from patients carrying B malignancies. NHL: Non Hodgkin Lymphoma, CBL: Cutaneous B Lymphoma. Three B cells lines are included as well as samples from healthy donors as controls. β -Actin is used as a control of protein loading level. CD20 expression detection is performed using a C-term polyclonal CD20 antibody. (*) showed additional bands excluding wt- and D393-CD20 protein signals. Chemiluminescence time exposure is 5 min.

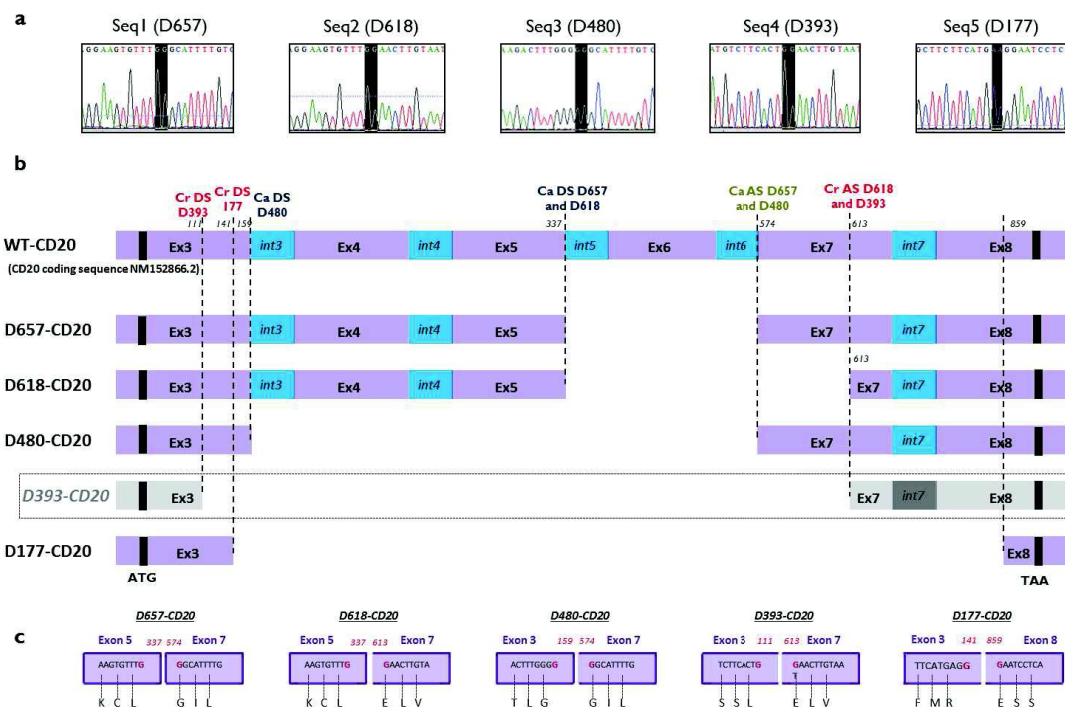


Figure 2 : Characterization of new alternative CD20-transcripts sequences

a/ Sequencing electrophoregrams showing junction areas resulting from alternative splicing. Number in brackets reports size length deletion in nucleotides, compare to the wtCD20 reference coding sequence. **b/** Schematic alignment of newly identified sequences with WT-CD20. Previously D393-CD20 sequence is framed. Canonic (Ca) or Cryptic (Cr) donor (DS) or acceptor (AS) splice sites are reported as well as their nucleotide position from +1ATG nucleotide (in italic). **c/** Schematic reconstitution of amino acid (AA) junction area after splicing involving canonical (closed boxes) or cryptic (open boxes) splice. AA sequence flanking junction is provided as well as AA position.

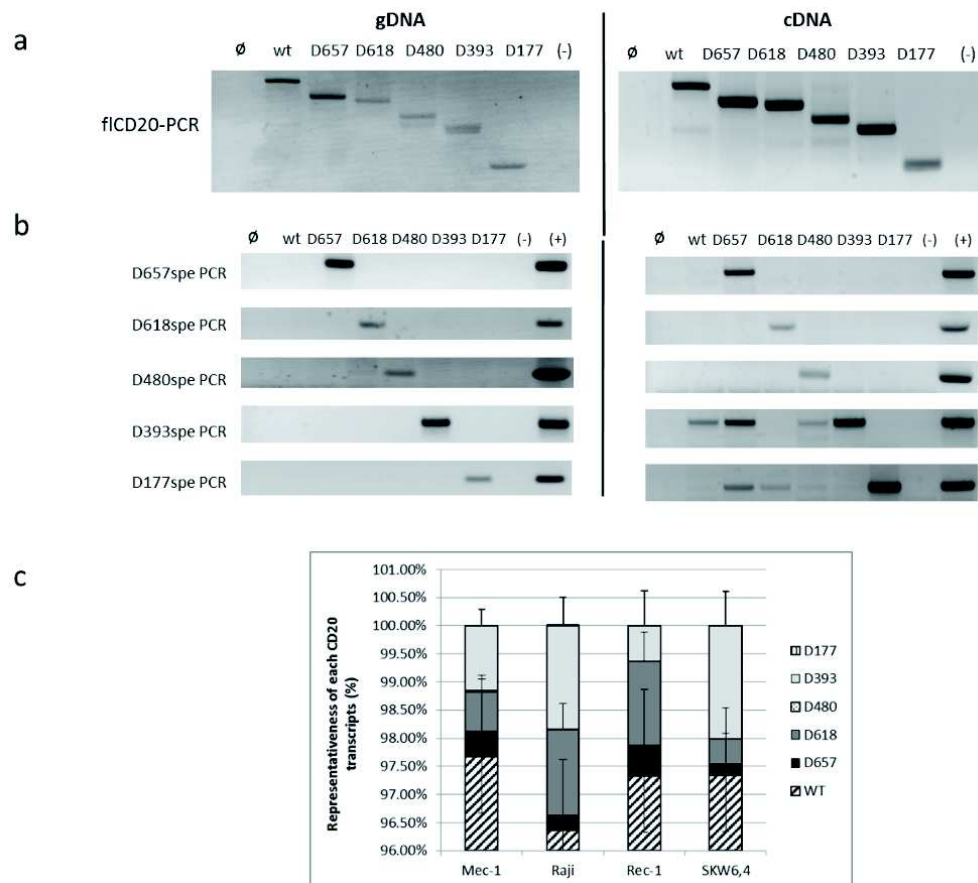


Figure 3 : RTPCR and RTqPCR assays of different CD20 transcript variants

a/ Full-Length PCR (fICD20) allows the amplification of every CD20 alternative transcripts. Genomic DNA (gDNA) from wild type PG13 (∅) and PG13 transfected by wt-CD20, D657-, D618-, D480-, D393- and D177-CD20 were amplified using specific primers of 5' (start codon) and 3' (stop) CD20 gene regions which is common to the 6 transcripts. H₂O has been used in negative control (-), and plasmid carrying specific CD20 variant has been added in positive control (+). **b/** CD20 variants specific PCRs have been designed to amplify specifically each alternative transcript. **c/** Representativeness in % of each different CD20-variant transcripts in 4 different B-cell lines. Means and SD is calculated from 7 independent experiments of RTqPCR quantification.

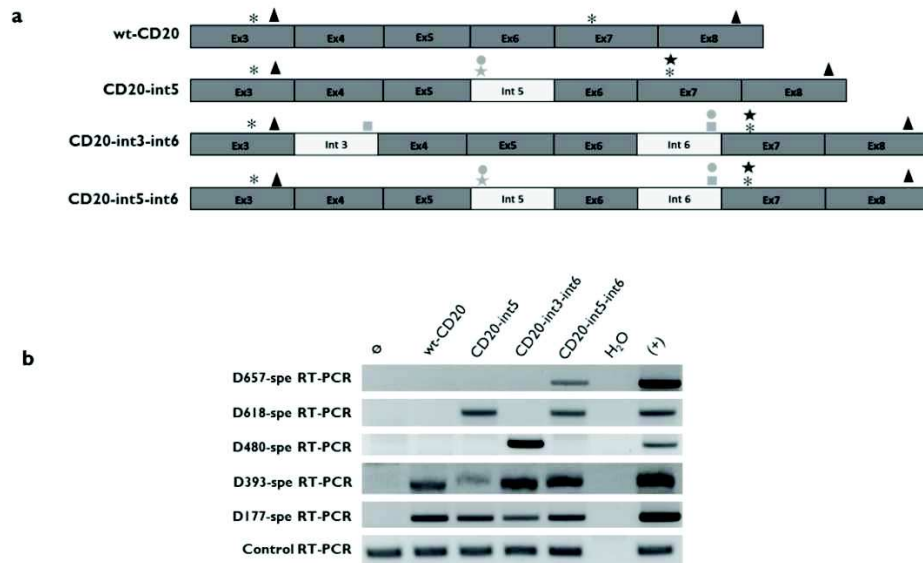


Figure 4: Introns reintroduction within the wt-CD20 coding sequence

a/ Schematic representation of position of alternative splice sites (ASS) in wt-CD20 coding sequence and within the constructs after reintroduction of introns 5 (CD20-int5), 3 and 6 (CD20-int3-int6) and 5 and 6 (CD20-int5-int6). ASS positions for D657 (●), D618 (★), D480 (■), D393 (*) and D177 (▲) are indicated. Gray and black symbols represent canonic and cryptic splice sites respectively. **b/** specific RTPCR detection of different CD20 variants in HT1080 transfected cell lines with different constructs. Plasmid is used as positive control and untransfected HT1080 cell as negative (ϕ). Raf amplification PCR is used as control the cDNA synthesis.

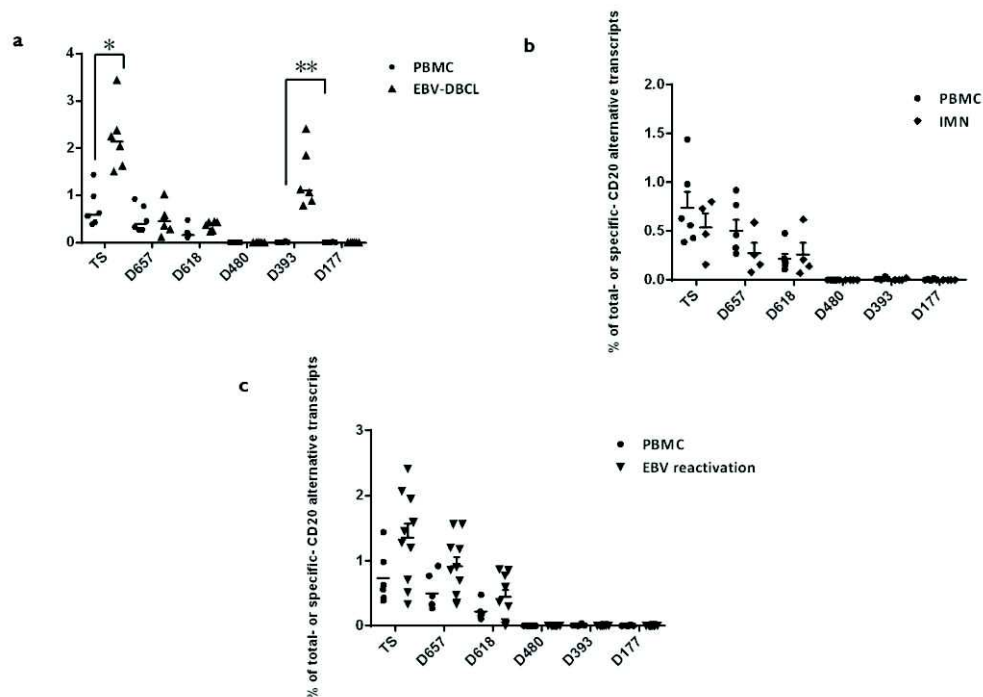


Figure 5: RTqPCR CD20 splicing variants quantification of EBV samples

Quantification by RTqPCR of total (TS) and specific CD20 splice variants of **a/** EBV-transformed B lymphoblastoid cell line BLCL (\blacktriangle) compare to their respective PBMC (\bullet), $n=6$. **b/** Infectious Mononucleosis (IMN, \blacklozenge , $n=4$), **c/** EBV reactivated samples (EBV load increase > 2 Log/ml. EBVr, \blacktriangledown , $n = 10$) after allograft compare to healthy PBMC (\bullet , $n=6$). (*) and (**) are Khi2 test with $p<0.02$ and $p<0.002$ respectively. CD20 transcripts quantification within PBMC is reported as reference in all total or specific splicing quantification.

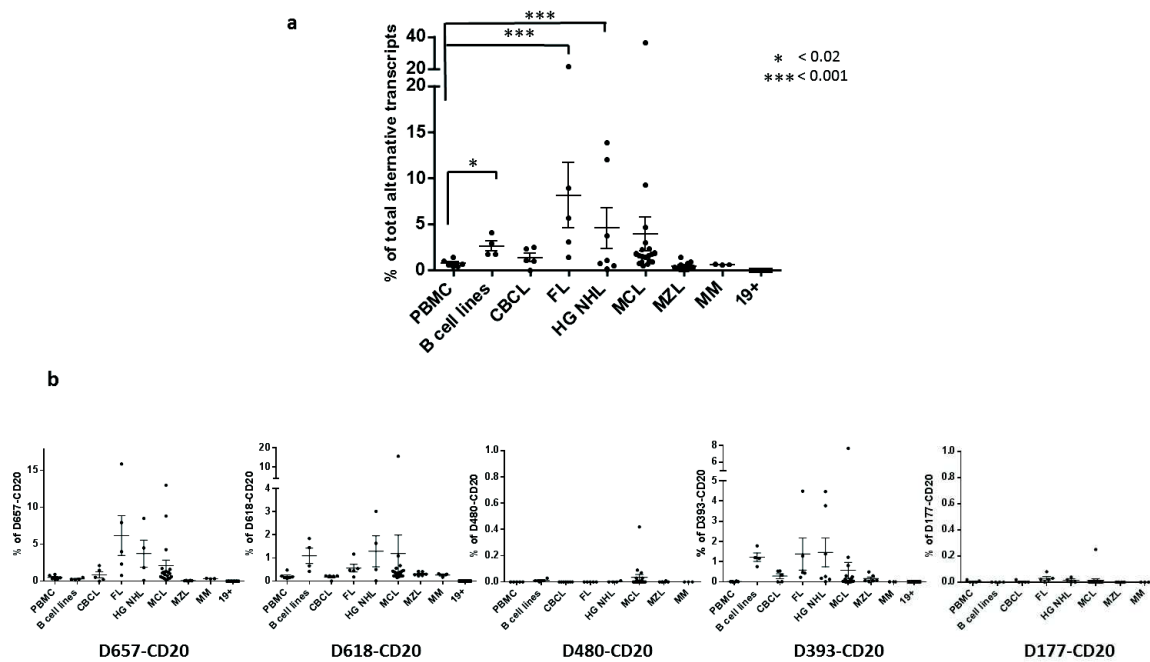


Figure 6: RTqPCR quantification of all CD20 Splice variants

Quantification by RTqPCR of total (**a**) or specific (**b**) CD20 splice variants in 4 different B cells lines ($n=4$), in different B-cell malignancies, compared to PBMC from healthy donors ($n=6$). CBCL: cutaneous B-cell lymphomas ($n=5$), FL: follicular lymphoma ($n=5$), DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma ($n=5$), MCL: mantle-cell lymphoma ($n=19$), MZL: Marginal Zone lymphoma ($n=12$), MM: multiple myeloma ($n=3$). (*) and (**) is Khi2 test with $p=0.01$ and $p<0.001$ respectively, compare to PBMC samples.

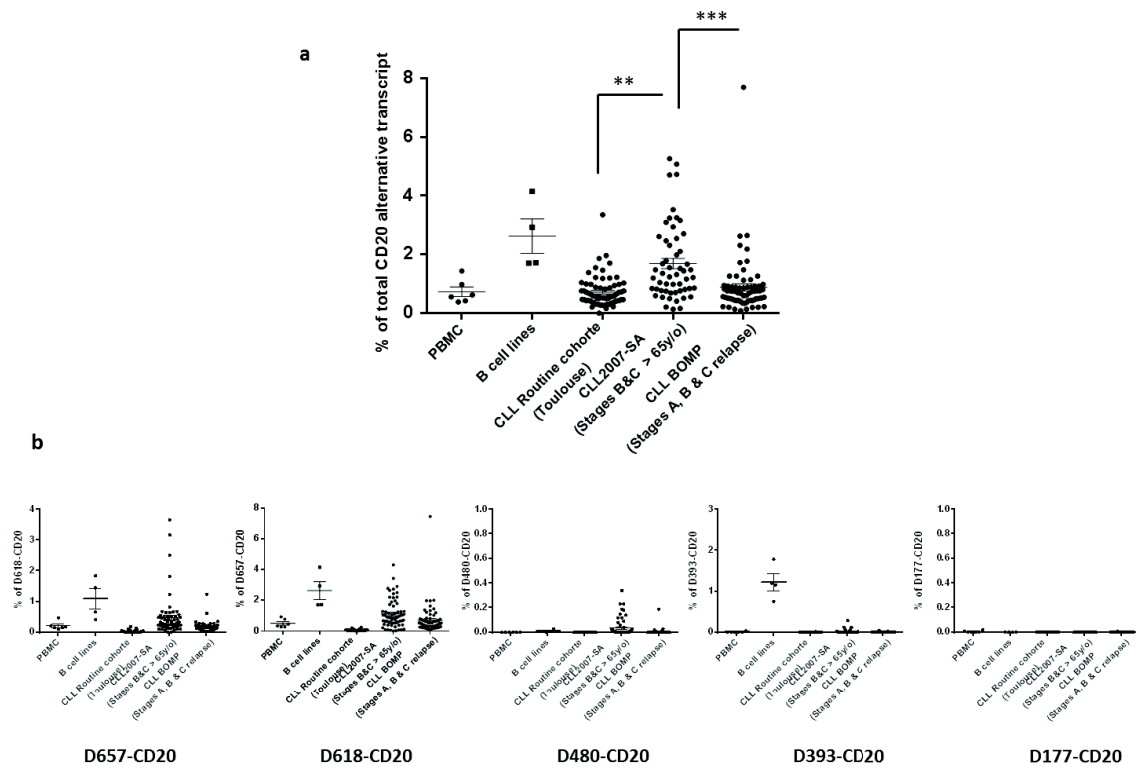


Figure 7 : Total or specific CD20-splice variants quantification within 3 different CLL cohorts

Quantification by RTqPCR of total (a) or specific (b) CD20 splice variants in 3 different cohorts of patients: routine collected CLL patient samples (50.8% - 49.1% stages A – B/C respectively) (CHU Toulouse, France, n=70), CD19 positive B-Cells purified from diagnosis stages B & C (65.5% & 34.5% respectively) elderly (> 65y/o – media 71.2) patient's CLL samples (CLL2007-SA trial (n=54), or from relapsed stages A, B or C (mainly stages B & C for 88.7%) with active disease patients (CLL01 BOMP clinical trial, n=70).

<u>Transcripts</u>	<u>Donor Site (DS)</u>				<u>Acceptor Site (AS)</u>				<u>Reading Frame</u>	<u>CDS (length)</u>	<u>Putative proteine</u>		<u>Junction Sequence</u>	
	<u>nt*</u>	<u>Cryptic (Cr) or canonical (Ca)</u>	<u>Location</u>	<u>Seq</u>	<u>nt*</u>	<u>Cryptic (Cr) or canonical (Ca)</u>	<u>Location</u>	<u>Seq</u>			<u>AA (length)</u>	<u>Size (kDa)</u>	<u>nt</u>	<u>AA</u>
D393-CD20	112	Cr	Ex3	GT	612	Cr	Ex7	AG	<u>Yes</u>	393bp	131	17-23 (15)	TTCAGTG/GAACTTG	RMSSL/ELVIA
D657-CD20	337	Ca	Int5	GC	573	Ca	Int6	AG	<u>Yes</u>	657bp	219	25	GTGTTTG/GGCATTT	SRKCL/GILSV
D618-CD20	337	Ca	Int5	GC	612	Cr	Ex7	AG	<u>Yes</u>	618bp	206	23	GTGTTTG/GAACTTG	SRKCL/ELVIA
D480-CD20	160	Ca	Int3	GT	573	Ca	Int6	AG	<u>Yes</u>	480bp	160	18	TTTGGGG/GGCATTT	SKTLG/GILSV
D177-CD20	142	Cr	Ex3	GA	858	Cr	Ex8	AG	<u>Yes</u>	177bp	59	6,5	CATGAGG/GAATCCT	SFFMR/ESSPI

Table 1: Summary of characteristics of CD20 splice variants transcripts

Supplementary Figures

Qualitative PCR (RTPCR)

PCR name	Name	Primer Forward Sequence (5'-3')	Name	Primer Reverse Sequence (5'-3')	Annealing Temperature	Size of PCR product(s) (bp)
fl-CD20	START	<u>ATG</u> ACAACACCCAGAAATTC	STOP	<u>TTA</u> AGGAGAGCTGTCATTTTCT	58°C	894, 657, 618, 480, 393, 177
D657	Fw-D657-spe	TCCAGGAAGT <u>GTTT</u> <u>G</u> /GGCAT	STOP	<u>TTA</u> AGGAGAGCTGTCATTTTCT	58°C	337
D618	Fw-C2	GGGATCTATGCACCCATCTGTGTGA	Rv-D618spe	CCAGCTATTACAAGTTC/CAAAC	60°C	130
D480	Fw-C1	CGGCAGAGCCAATGAAAGG	Rv-D480spe	CACTGACAAAATGCC/CCCCA	58°C	137
D393	Fw-D393-spe	GATGTCTTCACTG/GAACT	STOP	<u>TTA</u> AGGAGAGCTGTCATTTTCT	58°C	295
D177	START	<u>ATG</u> ACAACACCCAGAAATTC	Rv-D177-spe	ATTGGTGAGGATTC/CCTCA	55°C	155

Underline characters represent start and stop codons. (/) denotes splice junction. Fw: Forward primers, Rv: Reverse primers. Spe: splice variant specific primers

Real time quantitative PCR (RTqPCR)

qPCR name	Name	Primer Forward Sequence (5'-3')	Name	Primer Reverse Sequence (5'-3')	Probe Name	Probe Sequence (5'-FAM-3'-TAMRA)	Annealing Temperature
wtCD20	TQM-T1-CD20-Fw	ATTATTTCCGGATCACTCCT	TQM-CD20wt	TAATGAATTCATTGAGCCTC	T1-CD20	CAACGGAGAAAACTCCAGG	60°C
D657	TQM-T1-CD20-Fw	ATTATTTCCGGATCACTCCT	<i>TQM-Rv-D657-Spe</i>	TTTGGGCACTTTTGTCACTGA	T1-CD20	CAACGGAGAAAACTCCAGG	60°C
D618	TQM-T1-CD20-Fw	ATTATTTCCGGATCACTCCT	<i>TQM-Rv-D618-Spe</i>	TTTGGAACCTGTAATAGCTG	T1-CD20	CAACGGAGAAAACTCCAGG	60°C
D480	TQM-T2-CD20-Fw	CCTATTGCTATGCAATCTGG	<i>TQM-Rv-D480-Spe</i>	GGGGGGCACTTTTGTCACTGA	T2-CD20	AACCACTCTTCAGGAGGATG	60°C
D393	TQM-T2-CD20-Fw	CCTATTGCTATGCAATCTGG	<i>TQM-Rv-D393-Spe</i>	ACTGGAACCTGTAATAGCTG	T2-CD20	AACCACTCTTCAGGAGGATG	60°C
D177	START	<u>ATG</u> ACAACACCCAGAAATTC	STOP	<u>TTA</u> AGGAGAGCTGTCATTTTCT	<i>D177-spe</i>	AAAGCTTCTTCATGAGGGAATC	58°C
Control (Abl)	<i>Abl-Fw</i>	TGGAGATAACACTCTAAGCATAAAGGT	<i>Abl-Rv</i>	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA	TQM-Abl	CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACATT	60°C

Underline characters represent start and stop codons. Fw: Forward primers, Rv: Reverse primers. Spe (in bold): splice variant specific primers or bi-fluorescent probe.

Figure S1: Table of different primers used for wt-CD20 and transcript variants detection (RTPCR) as well as real time PCR quantification (RTqPCR).

Specific annealing temperature as well as PCR product size in bp length are given for RT-PCR. ABL PCR is used as control gene expression quantification.

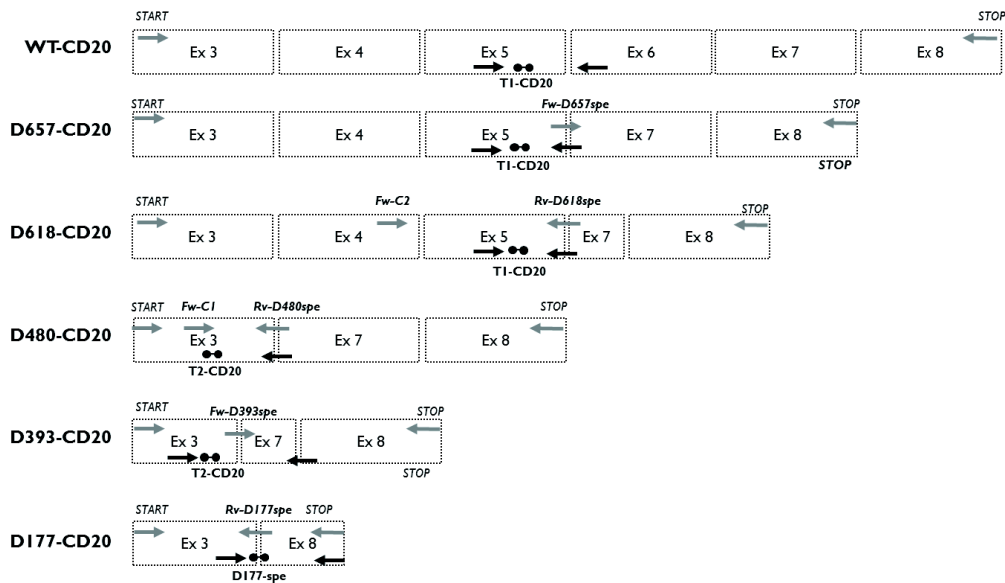


Figure S1 : Schematic design of RT-PCR or RTqPCR

Schematic representation of wt-CD20 and transcripts variants. Qualitative PCR primers as well as quantitative primers forward (→) and Reverse (←) and bi-fluorescent probes (•-•) are localized up and down respectively on the different transcripts

ATGACACCAACCCGABAATTTCAGTAATAGGGACATTTCCCGCAGGACGCATGAAGAGGCCCATATTGCTATGCAATTCTGGTGCACAAACACACTCTTCAGGAGGAATGTCCTTCACGTGGGGCCCCCAGCAGAACTCTTCTCATGAGGAAATCTA
AGATCTTTGGGGGGCTGCAGATATTAATGAGGGCTCTCCACATTCGCTGGGGGGCTCTTCGTATGATCCAGCAGGAGATCATGACCCACTGTGTGATCTGTGGTGACCTCTCTGGGAGGACCATATGATATATATTTTTCGGCATC
ACTCTGGCAGCAACGGAGAAAACTCCAGGAAGTGTTTGGCTCAAGGAAAAATGATAATGAATTCATTGAGCCTCTTTGCTGCCATTTCTGGAATGATTTCTTCAATCATGGACATACCTTAATATTAATAATTTCCCATTTTTTAAAA
ATGGAGAGCTCGAATTTTATAGAGCTCAGACACCATATTAATCATATACACCTGATGAAGAACAGCTCATCCCTCTGAGAAAACTCCCATCTCCCAACATATCTGCTGTTAGACGATACAACCTCTGTCTTGGGATATTTGTCAGTGTAGTC
TGATCTTTGGCTCTTCCAGGAATCTGTAATCTGGTGGCATCTGTGAGAAATGAATGAAAAGAACTGCTGCTCAGGCCAACTTAACTATCTTCCCTCTCAGCAGTAAGAAAAAGAGACAGCATATTGGAATTAAGAGAGAGATGGT
TGGGCTAACTGAAACATCTTCCCAACCAAGAAATGAAGAAGACATTGAAATTTATCCCAATCCAAAGAAAGAGAGAAAGAAACAGAGACGAACTTTCCAGAACCTCCCCAAGATCAGGAATCTCACCAATAGAAAAATGACAGCTCT
CTTAA

ATGACACACCCAGAAATTCAGTAAATGGGCTTTCCCGCGACAGGCCAATGAAGAGGCCCTATTGCTATGGRATCTGGTCCAAAGACCACTCTTCAGAGGAGTATGCTTCACTGGAACCTGTGAATAGCTGGCATCGTGAAGATGAATGGA
AAGAACGTCCTCTCCGCCCAAAATTCATACATAGTCTCTCTGTCAGCAGAAGAAAAGAAACAGACATATTGAATAAAGAAAGAGAGCTGTTGGCTCAACTGAAACATCTCTCCCAACCAAGAATGAAGAAGACATGAATGAATTTCC

ATGACACACCCAGAAATTTCAGTAAATGGGACCTTTCCGCGCAGAGCAATGAAGAGCCCATTTGCTATGCAATCTGGTCCAAACCACTCTTCAGGAGGATGTCTTCACCTGGTGGGCCCCAGCAAGACTCTTCATGAGGGAATCTAAGACTTCTGGGGGCTCCGAGATTGAATGGGCTCTCCACATCTGGGGGCTCTTCGATGATCCCGACGGGATCTATGCCAACTCTGTGACTGTGTGGTAACTCTGTGGGAGAGCATTATGTATATTCTTCGGGATACTCTCTGGGACACCGGAAAAAACTCCAGGAAGTGTTCGGGCAATTTTTCAGTGAATCTGCTATCTTGGCTCTCTCCAGGAAGTGTGAATAGCTGGCATCTGTGAGAACTGATGGAAAGAGCACTGCTCCAGCACTAACTTCAACATACTTCTCTCTCAGCAGAGAAAGAAAAAGACAAGCATTTGAAATAAAAGAAAGAGTCTTGGGCTAACTGAAACATCTCCCAACCAAGAAATGAAGAAGACTTGAAATATTCCCAATCCAGGAAGGAAGAAAGAAACAGAGACGAATCTTCCAGCACTCCCAAGTAGCAAGATCTCCACATAAGAAATGACAGCTCTCTCTTA

ATGACAAACCCCAAGAAATTCAGTAAATGGGACATTCCTCCGSCAGAGCCAAATGAAGGCCCATTTGCTATGCAATCTPGTCCAAACCAACTCTTCAGAGGAGTGTCTTCACGGTGGGCCCCAGCAAGCTCTTCATGAGGGAATCTAAGACTCTGGGGGGTCTCCAGATATTAATGGGCTCTCCACGATTCGCCCTGGGGGGTCTCTGATGATCCAGCAGGGATCTGCACCTCTGTGTGATCTGTGTGGGTACCTCTCTCTGGGAGGCAATATGATATTAATTTCTCCGGATACCTCTCGGACAGCAACGGAAAAAATCTCAGGAAGTGTGGGAATCTGTAATGAGCTGGCATCTGTGAGAATGAATGGAAAAAGAACTGCTCTCAGACCCAAATCTACGATATTTCTCTGTCTCGGACAGGAAGAAAAAAGAAACAGACTATTGAAATTAAGAGAAAGTGTGTGGGCTAACTGAAACACTCTCCCAACCAAGAAATGAAGAAGACATTAAGAAATTAATTCCAATCCAAGAGAGGAAGAAGAAAGAACAGAGACGAATCTTCAGAACCTCCCAAGATCAGGAATCCTCACCAATAGAAATGAGAGCTCTTAA

ATGACAACACCCGAAATTTCAGTAAATGGGACTTTCCTCCGGCAGAGCCAAATGAAAGGCCCTATTGCTATGCAATCTGGTCCAAACCACCTCTTCAGGAGGATGTCTTCACGTGGTGGGCCCCACGCAAGCTTCTTCATGAGGGAATCTAAGACTTTGGGGGGCATTTCAGTGATCTGATCTTCGGCTCTTCAGGAACCTGTAAATAGCTGGCATCGTTGAGAAATGAATGGAAGAAAGACGTGCTCCAGACCCAAATCTAACATAGTTCTTCCTGTGACGAGAGAAAGAAAAAGACAAGACTTGAATAAAAGAGAGTGGTTGGGCTAACTGAACACTTCTCCCAACCAAGATGAAGAGAAATGAAATCTTCCAAATCCAAGAGAGGAAGAAGAAAGACAGAGCAACCTTTCAGAACCTCCCAAGATCAGACACTCCACCAATGAGAAATGAGACTTCTCCCTAA

ATGACAAACCCAGAAATTCAGTAAATGGGACTTTCCCGGCAGAGCCAAATGAAAGGCCCTATTGCTATGCAATCTGGTCCAAAACCACTCTTCAGGAGGATGTCTTCACTGGTGGGCCCCACGCAAAGCTTCTTCATGAGGGAAATCCT
CACCAATAGAAAATGACAGCTCTCCTTAA

wt-CD20 coding sequence (NCBI-Genbank NM152866.2) given as reference as well as D393-CD20, previously described (Henry et al, Blood 2010) are provided in blue. The 4 new identified coding sequence of the CD20 alternative transcripts are provided in blue.

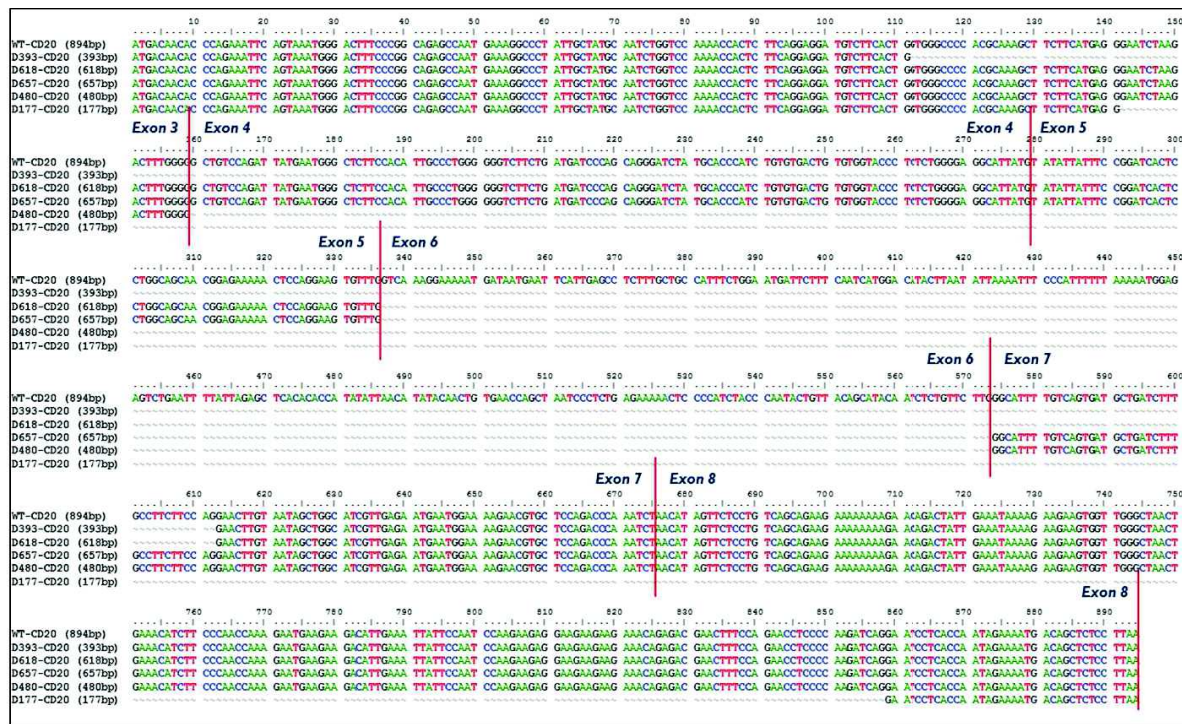


Figure S4 : alignment of the 4 newly Sanger-sequenced sequences against CD20 reference sequence (NCBI-Genebank NM152866.2)

Alignment of the newly discovered sequences against the wt-CD20 coding sequence using the BioEdit v7.1 software. It allowed to perfectly identified junction sequences area.

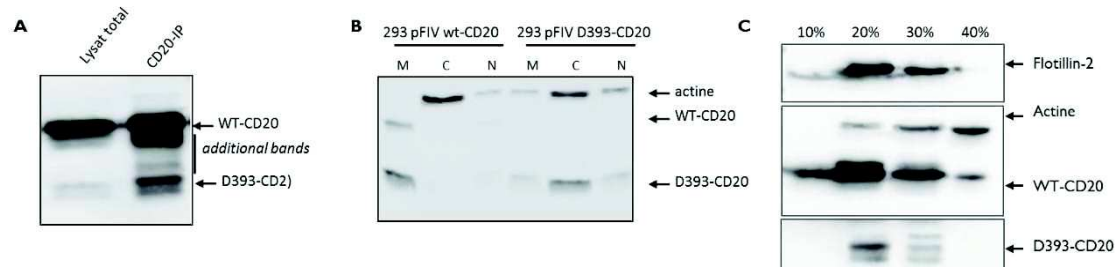


Figure S5: Alignment of the newly discovered sequences against the wt-CD20 coding sequence using the BioEdit v7.1 software. It allowed to perfectly identified junction sequences area.

a/ CD20-immuno-precipitation (IP) was perform using an antibody specific of an extracellular epitope of CD20 (Ref xxx) and western blot detection with the c-term CD20 antibody (Ref XX). **b/** Subcellular fractions [Membrane (M), Cytoplasm (C), Nucleus (N)] were obtained from 293 cells transfected with a lentiviral vector pFIV-D393-CD20 or pFIV-wtCD20 were subjected to WB analysis using the c-term CD20 or actin (for protein loading control) antibodies. Blotted proteins were detected and quantified on a bioluminescence imager and BIO-1D advanced software (Wilber-Lourmat) after incubating blots with a horseradish peroxidase-conjugated appropriate secondary antibody (Beckman Coulter). **c/** Lipid rafts isolation by ultra-centrifugation on sucrose density gradient. Fractions 1 to 4 (10% to 40% of sucrose density) respectively harvested after centrifugation were subjected to c-term anti-CD20 western blotting. Actin and Flotillin-2 antibodies staining was used as control of protein loading or lipid rafts respectively.

Acknowledgements

The authors thank Dr Alain Coaquette (Service de virology, CHU Besançon, France), for providing post-transplant EBV samples and Dr Bernard ROYER (INSERM UMR1098) for assistance in the statistical analysis.

References

1. Algino KM, Thomason RW, King DE, Montiel MM, Craig FE. CD20 (pan-B cell antigen) expression on bone marrow-derived T cells. *Am J Clin Pathol.* 1996;106(1):78-81.
2. Tedder TF, Forsgren A, Boyd AW, Nadler LM, Schlossman SF. Antibodies reactive with the B1 molecule inhibit cell cycle progression but not activation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1986;16(8):881-7.
3. Li H, Ayer LM, Lytton J, Deans JP. Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *J Biol Chem.* 2003;278(43):42427-34. doi:10.1074/jbc.M308802200.
4. Niederfellner G, Lammens A, Mundigl O, Georges GJ, Schaefer W, Schwaiger M et al. Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood.* 2011;118(2):358-67. doi:10.1182/blood-2010-09-305847.
5. Buske C, Unterhalt M, Hiddeman W. [Therapy of follicular lymphoma]. *Der Internist.* 2007;48(4):372-81. doi:10.1007/s00108-007-1804-2.
6. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;346(4):235-42. doi:10.1056/NEJMoa011795.
7. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, Kotowski A, Binder A, Kaur H et al. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin Cancer Res.* 2008;14(5):1561-70.
8. Tedder TF, Klejman G, Schlossman SF, Saito H. Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J Immunol.* 1989;142(7):2560-8.
9. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature genetics.* 2008;40(12):1413-5. doi:10.1038/ng.259.
10. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2014;15(2):108-21. doi:10.1038/nrm3742.
11. Kar SA, Jankowska A, Makishima H, Visconte V, Jerez A, Sugimoto Y et al. Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 2013;98(1):107-13. doi:10.3324/haematol.2012.064048.
12. Pajares MJ, Ezponda T, Catena R, Calvo A, Pio R, Montuenga LM. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol.* 2007;8(4):349-57. doi:10.1016/S1470-2045(07)70104-3.
13. Bonomi S, Gallo S, Catillo M, Pignataro D, Biamonti G, Ghigna C. Oncogenic alternative splicing switches: role in cancer progression and prospects for therapy. *International journal of cell biology.* 2013;2013:962038. doi:10.1155/2013/962038.
14. Kirschbaum-Slager N, Lopes GM, Galante PA, Riggins GJ, de Souza SJ. Splicing factors are differentially expressed in tumors. *Genet Mol Res.* 2004;3(4):512-20.
15. Brinkman BM. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem.* 2004;37(7):584-94. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.05.015.
16. Mercatante DR, Mohler JL, Kole R. Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49374-82. doi:10.1074/jbc.M209236200.

17. Villemaire J, Dion I, Elela SA, Chabot B. Reprogramming alternative pre-messenger RNA splicing through the use of protein-binding antisense oligonucleotides. *J Biol Chem.* 2003;278(50):50031-9. doi:10.1074/jbc.M308897200.
18. Wan Y, Wu CJ. SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2013;121(23):4627-34. doi:10.1182/blood-2013-02-427641.
19. Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, Jankowska AM, Abu Kar S, Jerez A et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood.* 2012;119(14):3203-10. doi:10.1182/blood-2011-12-399774.
20. Li Z, Pan L, Cesarman E, Knowles DM. Alterations of mRNA splicing in primary effusion lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2003;44(5):833-40. doi:10.1080/1042819031000068043.
21. Verma D, Bais S, Gaillard M, Swaminathan S. Epstein-Barr Virus SM protein utilizes cellular splicing factor SRp20 to mediate alternative splicing. *Journal of virology.* 2010;84(22):11781-9. doi:10.1128/JVI.01359-10.
22. Henry C, Deschamps M, Rohrlisch PS, Pallandre JR, Remy-Martin JP, Callanan M et al. Identification of an alternative CD20 transcript variant in B cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance. *Blood.*
23. Small GW, McLeod HL, Richards KL. Analysis of innate and acquired resistance to anti-CD20 antibodies in malignant and nonmalignant B cells. *PeerJ.* 2013;1:e31. doi:10.7717/peerj.31.
24. Dogan RI, Getoor L, Wilbur WJ, Mount SM. SplicePort--an interactive splice-site analysis tool. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W285-91. doi:10.1093/nar/gkm407.
25. Wang M, Marin A. Characterization and prediction of alternative splice sites. *Gene.* 2006;366(2):219-27. doi:10.1016/j.gene.2005.07.015.
26. Maciejewski JP, Padgett RA. Defects in spliceosomal machinery: a new pathway of leukaemogenesis. *Br J Haematol.* 2012;158(2):165-73. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09158.x.
27. Dartigeas C, Van Den Neste E, Berthou C, Maisonneuve H, Lepretre S, Dlhuydy MS et al. Evaluating abbreviated induction with fludarabine, cyclophosphamide, and dose-dense rituximab in elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2015;1-19. doi:10.3109/10428194.2015.1063139.
28. Gamonet C, Deschamps M, Marion S, Herbein G, Chiocchia G, Auger I et al. The alternative CD20 transcript variant is not a surrogate marker for resistance to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2015;54(9):1744-5. doi:10.1093/rheumatology/kev210.
29. Gamonet C, Ferrand C, Colliou N, Musette P, Joly P, Girardin M et al. Lack of expression of an alternative CD20 transcript variant in circulating B cells from patients with pemphigus. *Experimental dermatology.* 2014;23(1):66-7. doi:10.1111/exd.12299.
30. Jazirehi AR, Bonavida B. Development of rituximab-resistant B-NHL clones: an in vitro model for studying tumor resistance to monoclonal antibody-mediated immunotherapy. *Methods in molecular biology.* 2011;731:407-19. doi:10.1007/978-1-61779-080-5_33.
31. Walshe CA, Beers SA, French RR, Chan CH, Johnson PW, Packham GK et al. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2008;283(25):16971-84. doi:10.1074/jbc.M708459200.
32. Verma D, Swaminathan S. Epstein-Barr virus SM protein functions as an alternative splicing factor. *Journal of virology.* 2008;82(14):7180-8. doi:10.1128/JVI.00344-08.
33. Juillard F, Bazot Q, Mure F, Tafforeau L, Macri C, Rabourdin-Combe C et al. Epstein-Barr virus protein EB2 stimulates cytoplasmic mRNA accumulation by counteracting the deleterious effects of SRp20 on viral mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(14):6834-49. doi:10.1093/nar/gks319.
34. Hu Y, Ericsson I, Doseth B, Liabakk NB, Krokan HE, Kavli B. Activation-induced cytidine deaminase (AID) is localized to subnuclear domains enriched in splicing factors. *Experimental cell research.* 2014;322(1):178-92. doi:10.1016/j.yexcr.2014.01.004.
35. Kvissel AK, Orstavik S, Eikvar S, Brede G, Jahnsen T, Collas P et al. Involvement of the catalytic subunit of protein kinase A and of HA95 in pre-mRNA splicing. *Experimental cell research.* 2007;313(13):2795-809. doi:10.1016/j.yexcr.2007.05.014.
36. Nakatsugawa M, Hirohashi Y, Torigoe T, Asanuma H, Takahashi A, Inoda S et al. Novel spliced form of a lens protein as a novel lung cancer antigen, Lengsin splicing variant 4. *Cancer science.* 2009;100(8):1485-93. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01187.x.

37. Idenoue S, Hirohashi Y, Torigoe T, Sato Y, Tamura Y, Hariu H et al. A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins. *Clin Cancer Res*. 2005;11(4):1474-82. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0817.
38. Vauchy C, Gamonet C, Ferrand C, Daguindau E, Galaine J, Beziaud L et al. CD20 alternative splicing isoform generates immunogenic CD4 helper T epitopes. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015;137(1):116-26. doi:10.1002/ijc.29366.
39. Rossi D, Bruscaggin A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118(26):6904-8. doi:10.1182/blood-2011-08-373159.
40. Zent CS, Burack WR. Mutations in chronic lymphocytic leukemia and how they affect therapy choice: focus on NOTCH1, SF3B1, and TP53. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2014;2014(1):119-24. doi:10.1182/asheducation-2014.1.119.
41. Quesada V, Ramsay AJ, Lopez-Otin C. Chronic lymphocytic leukemia with SF3B1 mutation. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2530. doi:10.1056/NEJMc1204033.

Lack of expression of an alternative CD20 transcript variant in circulating B cells from patients with pemphigus

Le pemphigus vulgaire est une pathologie auto-immune cutanéomuqueuse bulleuse impliquant les lymphocytes B. Le traitement de cette maladie par l'anticorps monoclonal anti-CD20 Rituximab (RTX) a considérablement amélioré la prise en charge des patients réfractaires ou non-répondeurs.

L'expression de D393-CD20 a été largement évaluée dans les hémopathies malignes, et il a semblé intéressant d'étudier si les mêmes dérégulations de l'épissage étaient observées dans des lymphocytes B auto-réactifs.

Les patients atteints de pemphigus étant par ailleurs d'excellents répondeurs au RTX, il serait intéressant d'identifier un marqueur de résistance pour les 5% de patients réfractaires.

Vingt-cinq prélèvements de patients atteints de pemphigus vulgaire ou foliacé ont été analysés au diagnostic par RT-PCR et RT-qPCR spécifiques des variants WT-CD20 et D393-CD20. Une activation in vitro des lymphocytes B a également été réalisée afin d'étudier si l'expression de D393-CD20 était induite par l'activation comme cela avait été décrit précédemment.

Parmi les 25 patients étudiés, aucun n'exprime le variant D393-CD20 ni avant ni après activation. Ces résultats suggèrent une dérégulation de l'épissage de cd20 qui serait plutôt associée à l'oncogenèse qu'à l'activation ou la prolifération des cellules telles que c'est le cas dans le développement de maladies auto-immunes.

Lack of expression of an alternative CD20 transcript variant in circulating B cells from patients with pemphigus

Clémentine Gamonet¹, Christophe Ferrand¹, Natacha Colliou², Philippe Musette², Pascal Joly², Marie Girardin³, Philippe Humbert⁴ and François Aubin³

¹Inserm UMR 1098, Etablissement Français du Sang Bourgogne-Franche Comté, Besançon, France; ²Clinique Dermatologique, Hôpital Charles Nicolle, Rouen, France; ³Université de Franche Comté, EA3181, SFR 4234 et Service de Dermatologie, CHU de Besançon, Besançon, France;

⁴Université de Franche Comté, Inserm UMR1098, SFR 4234 et Service de Dermatologie, CHU de Besançon, Besançon, France

Correspondence: Pr François Aubin, Service de Dermatologie, 3 Boulevard Alexandre Fleming, 25030 Besançon Cedex, France. Tel.: +33381218483, Fax: +33381218482, e-mail: francois.aubin@univ-fcomte.fr

Abstract: We have identified a spliced mRNA transcript of CD20 (named D393-CD20) which was associated with resistance to RTX in primary B cell from patients with lymphoma and leukaemia. In the present work, we wished to investigate whether D393-CD20 variant was expressed by B cells from patients with pemphigus. Ten patients with bullous pemphigoid and twenty-five patients with pemphigus were included. All patients were responder to conventional immunosuppressive agents or rituximab ($n = 11$). Efficacy of B-cell activation by pokeweed mitogen was assessed by CD86 expression using a FACS Canto II flow cytometer. mRNA CD20 expression study was then performed using RT-PCR assay allowing first to discriminate wild-type (wt)-CD20 and

D393-CD20 transcript. Although wt-CD20 expression was always detected, we were unable to detect D393-CD20, even after B-cell activation or RTX treatment. Our results suggest that D393-CD20 transcript may be a molecular marker of B-cell malignancies rather than autoimmune disease like pemphigus. Further study of RTX non-responders or non-escaping PV patients is thus still required to appreciate whether D393-CD20 expression may be detected under the pressure of RTX therapy.

Key words: CD20 – pemphigus – rituximab

Accepted for publication 3 December 2013

Background

Pemphigus is a potentially life-threatening mucocutaneous autoimmune disorder characterized by suprabasal acantholysis produced as a consequence of desmoglein and non-desmoglein autoantibodies binding to several targeting molecules localized on the membrane of keratinocytes (1). Rituximab (RTX) has opened a new avenue for severe and refractory pemphigus patients (2,3). In a previous study, we have identified a spliced mRNA transcript of CD20 (named D393-CD20) in primary B cell from patients with lymphoma and leukaemia (4). Although this transcript was not detected in PBMCs from healthy donors, it was expressed by *in vitro* EBV-transformed B-cell lines or pokeweed-activated B cells. In a previous study (4), we demonstrated that D393-CD20 transcripts and protein increase after repeated *in vitro* Rituximab (RTX) exposure as well as in patients with B-cell malignancies after RTX resistance or escape. The function and mechanism of action of the D393-CD20 protein are not yet completely elucidated. We hypothesize that D393-CD30 protein interacts with wt-CD20 by modulating the cell surface expression or by preventing the distribution of wt-CD20 within the lipid raft after RTX exposition. We have already shown that D393-CD20 is associated with wt-CD20 and modulated its expression. We also found that a more important amount of D393-CD20 is present within the lipid raft. To our knowledge, this study is the first to investigate the expression of D393-CD20 transcripts in an autoimmune disease which may be efficiently treated with RTX.

Question addressed

In the present work, we wished to investigate whether D393-CD20 variant was expressed by B cells from patients with pemphigus vulgaris (PV) and foliaceus (PF).

Experimental design

Ten patients with bullous pemphigoid and twenty-five patients with pemphigus were investigated at the time of diagnosis before any systemic treatment or during follow-up (for details, see Data S1). Efficacy of B-cell activation by pokeweed mitogen (PWM) was assessed by CD86 expression using a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). CD45, CD20 (BD Biosciences), CD19 (Beckman Coulter, Fullerton, USA) and CD86 (Diacclone, Besançon, France) antibodies were used. Paired t-test was used for statistical analysis.

Total cellular RNAs were extracted using the RNeasy Total RNA Isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany). For qualitative PCR, 1 µg of total RNA was reverse transcribed into cDNA (5). mRNA CD20 expression study was then performed using RT-PCR assay allowing first to discriminate wild-type (wt)-CD20 and D393-CD20 transcript. A more sensitive RT-PCR assay, using a specific primer spanning the splice fusion area, was then used to detect more specifically the D393-CD20 transcript only (4).

Results

All patients (Table S1) were responder to conventional immunosuppressive agents ($n = 24$; steroids, azathioprine, mycophenolate mofetil, cyclosporine, methotrexate, immune globulins) or rituximab ($n = 11$). *In vitro* B-cell activations were performed in 12

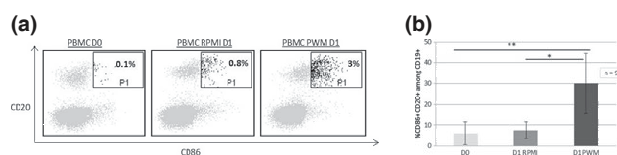


Figure 1. Representative experiment of CD86⁺ expression among CD19-positive B-lymphocytes in PBMC and after 1 day of culture in the absence (PBMC RPMI D1) or presence (PBMC PWM D1) of pokeweed mitogen (PWM) at 2 μ g/ml. Percentages of CD86-positive cells are shown. (a) Cytometry dot plot showing CD20 and CD86 expression among the CD45⁺ population. Percentage of CD20⁺/CD86⁺ cells is reported in the gate P1 (b) Diagram showing median of percentage cell number of CD20⁺/CD86⁺ expression among CD19⁺ population ($n = 9$). * $P = 0.003$, ** $P < 0.001$.

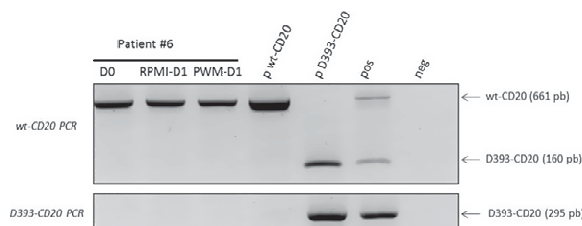


Figure 2. RT-PCR analysis of wt-CD20 and D393-CD20 transcripts performed on cDNA from PBMC (D0) of patient suffering from pemphigus vulgaris, after one day of culture in the absence (PBMC RPMI-D1) or presence (PBMC PWM-D1) of pokeweed mitogen (PWM) at 2 μ g/ml. Wild-type-CD20 (wt-CD20) PCR allowed amplification of both wt-CD20 and D393-CD20 transcripts. D393-CD20 PCR allowed specifically D393-CD20 transcripts amplification using a primer spanning the splicing junction. Plasmid wt-CD20 (pwt-CD20), D393 (pD393-CD20) and cDNA from B-cell line were added as positive controls. H₂O was used in negative control (Neg).

patients with PV, nine were successful. The remaining three patients were treated with RTX and did not demonstrate any residual B cells. A representative experiment is reported on Fig. 1. Median percentages of CD86⁺ cells were 6.97 ± 5.47 in PBMC, 7.66 ± 5.47 and 30.81 ± 14.19 after 1 day of culture, respectively, without or with PWM. We observed a 4.45 ± 1.45 time increase expression of the number of CD86⁺ among CD20 positive cells was observed after 1 day of culture in cells treated by PWM ($P < 0.001$). As expected (4), D393-CD20 transcript was not detected in PBMC obtained from healthy donors. Although wt-CD20 expression was always detected in all samples collected from patients with pemphigus, we were unable to detect D393-CD20, even with the more sensitive RT-PCR assay allowing to target the spliced form of transcripts (Fig. 2). Similar negative results were observed in eight patients before RTX and during remission and in patients with bullous pemphigoid. Moreover, we quantified

wtCD20 mRNA expression using RT-qPCR in healthy controls (HC, $n = 3$) as well as in some patients when residual ARN was available. Wt-CD20 mRNA amount, normalized against GAPDH, was 0.046 ± 0.03 in HC, 0.21 ± 0.04 , 1.6 ± 1.5 , 0.66 ± 0.038 , respectively, in three BP, three PV and three autoimmune diseases (cutaneous vasculitis). However, the number of samples tested was not large enough for statistical analysis.

Discussion

The present study showed that, on the contrary of leukaemic or lymphoma B cells (4), circulating B cells from patients with pemphigus or pemphigoid bullous did not express D393-CD20 transcript even after activation. *In vitro* B-cell activation confirmed indeed that patients were not deficient for B-cell activation and therefore potential expressers of D393-CD20 in activated B cells.

In a previous study, we demonstrated that the D393-CD20 variant was associated with resistance to rituximab (4). In our study, we cannot exclude that the D393-CD20 variant might be only present in patients with pemphigus resistant to rituximab. However, all our patients were responder to treatments, either conventional immunosuppressive drugs or rituximab. The lack of D393-CD20 transcript expression in our series along with the successful treatment with rituximab suggests no specific implication for the management of these patients. Furthermore, in contrast to patients with B-cell malignancies, resistance to rituximab is rarely observed in patients with pemphigus (3). In 95% of the 136 pemphigus patients reported in the literature, at least a partial remission has been achieved. However, it would be very interesting to have a biomarker to identify them.

Our results suggest that D393-CD20 transcript may be a molecular marker of B cell malignancies rather than autoimmune disease like pemphigus. Further study of RTX non-responders or non-escaping PV patients is thus still required to appreciate whether D393-CD20 expression may be detected under the pressure of RTX therapy.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Société Française de Dermatologie (AO 2011).

Author contributions

CG, CF and FA designed the research study. CG, NC, MG, CF and FA performed experiments, analysed data, prepared the Figures and Table, and drafted the manuscript under the supervision of PM, PJ and PH. CG, CF and FA wrote the paper. CG, CF and FA reviewed the paper.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 España A, Mòdol T, Gil M P *et al.* *Exp Dermatol* 2013; **22**: 125–130.
- 2 Joly P, Mouquet H, Roujeau J C *et al.* *N Engl J Med* 2007; **357**: 545–552.
- 3 Schmidt E, Goebeler M, Zillikens D. *Ann N Y Acad Sci* 2010; **1173**: 683–691.
- 4 Henry C, Deschamps M, Rohrlrich P S *et al.* *Blood* 2010; **115**: 2420–2429.
- 5 Ferrand C, Robinet E, Contassot E *et al.* *Hum Gene Ther* 2000; **11**: 1151–1164.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. Experimental design.

Table S1. Baseline characteristics of patients with Pemphigus and with bullous pemphigoid.

The alternative CD20 transcript variant is not a surrogate marker for resistance to rituximab in patients with rheumatoid arthritis

La polyarthrite rhumatoïde est une forme de rhumatisme inflammatoire chronique causée par la destruction de la membrane synoviale articulaire provoquant à terme la déformation des articulations. L'inflammation chronique est caractérisée par la sécrétion d'auto-anticorps dirigés contre des protéines citrullinées, la production d'anticorps anti-IgG appelés facteurs rhumatoïdes, ainsi qu'une importante quantité de cytokines pro-inflammatoires dont TNF- α , IL-6 et IL-1.

L'utilisation du Rituximab (RTX) permet une efficace déplétion des lymphocytes B auto-immuns, et plusieurs facteurs prédictifs de la réponse ont été identifiés. Nous avons souhaité étudier si l'expression de D393-CD20 était exprimée par ces lymphocytes B auto-réactifs, et si des différences existaient entre les patients répondeurs et non-répondeurs.

Pour ce faire, 3 types de prélèvements ont été étudiés : des cellules mononuclées (PBMC) de patients traitées par RTX ont été prélevées au diagnostic puis 3 mois, 6 mois, et 9 mois après le début du traitement. Des prélèvements de membrane synoviale ont également été analysés, de même que des PBMC de patients non-répondeurs au RTX.

D393-CD20 n'a été observé dans aucun des prélèvements étudiés, supposant là encore que la dérégulation de l'épissage de cd20 est marqueur de malignité mais pas d'auto-immunité. De plus, ce variant n'est en aucun cas prédictif d'une réponse au RTX.

Rheumatology 2015;54:1744–1745

doi:10.1093/rheumatology/kev210

Advance Access publication 27 June 2015

The alternative CD20 transcript variant is not a surrogate marker for resistance to rituximab in patients with rheumatoid arthritis

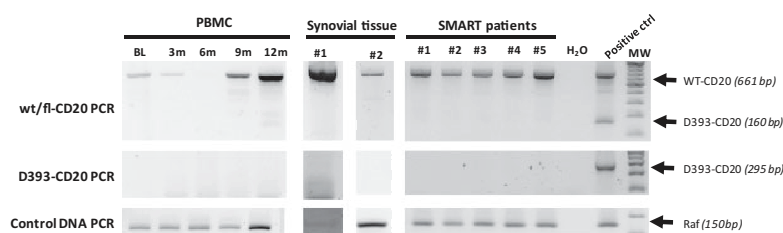
SIR, B-cell depletion represents a promising target in RA treatment. Rituximab (RTX), a chimeric mAb directed against the membrane-anchored CD20 protein expressed on B cells, has proved to be effective in RA. Predictive factors for RTX response in RA have been identified from phase III clinical trials and observational studies. A good clinical response in RA correlates with RF positivity and ACPA expression [1]. Other factors include lower levels of circulating IFN- γ and B-cell activating factor (BAFF), Fc γ RIII genotype, *IL-6* promoter polymorphism-174, and CD20 cell surface expression [1]. Recently, a spliced mRNA transcript of CD20 (named D393-CD20) was identified in malignant B cells from lymphoma and leukaemia patients [2]. This transcript was not found in B cells from healthy subjects (HSs), but was induced *in vitro* after activation or EBV-induced transformation [2]. This alternative *cd20* transcript codes a protein lacking the extracellular domain (which includes the RTX epitope), leading to an intracytoplasmic localization. We previously demonstrated that the *d393-cd20* transcript and D393-CD20 protein increased after RTX exposure in patients with B-cell malignancies resistant to RTX therapy [2]. While the function of D393-CD20 remains unknown, we hypothesize that the D393-CD20 protein interacts with wild-type/full-length (*wt/fl*) CD20 and modulates its cell surface expression or prevents its distribution within the lipid raft [2]. Expression of D393-CD20 has not been studied in RA.

In a first cohort, 23 RA patients [17 female, mean age 60.1 years (S.E.M. 2.7), mean disease duration 13.3 years (S.E.M. 1.7), positive RF: 19/23, positive ACPAs: 19/23] and 20 HSs [15 female, mean age 59.6 (S.E.M. 2.6)] were evaluated after informed consent and ethical approval from the ethics committee (Le Comité de Protection des Personnes Est II) was obtained. Patients were under traditional DMARDs (MTX, $n=12$), low corticosteroids (<10 mg/day, $n=14$) and/or anti-TNF α agents ($n=16$), but none had received RTX. Five patients [5 female, mean age 63.8 years (S.E.M. 5), mean disease duration 20.8 years (S.E.M. 5.2), positive RF: 4/5, positive anti-CCP antibodies: 4/5] who were eligible for RTX were evaluated prior to the first RTX infusion and during a 1-year follow-up period. Synovial biopsies were obtained from five other RA patients [4 female, mean age 55.2 years (S.E.M. 10.3), mean disease duration 10.1 years (S.E.M. 5.2)] during surgery for joint arthroplasty. Total and cellular RNA was extracted using a RNeasy Total RNA Isolation kit (Qiagen,

Hilden, Germany). Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed into cDNA. Then, qualitative RT-PCR (qRT-PCR) assays were performed to discriminate the *wt/fl-cd20* and *d393-cd20* transcripts; a more sensitive qRT-PCR, using a specific primer spanning the splice fusion area, was used to detect more specifically only the *d393-cd20* transcript, as previously described [3].

The circulating B cell number per millilitre did not differ between RA patients and HSs [mean (S.E.M.): 184 (22) vs 211 (27), respectively]. Among the 23 RA samples (first cohort), whereas the *wt/fl-cd20* mRNA was always detected, no *d393-cd20* mRNA was detected, even with the more sensitive qRT-PCR (Fig. 1). Among the five patients who received RTX, four responded to treatment [DAS28 at baseline, 6 months and 12 months, mean (S.E.M.): 4.6 (0.5), 3.2 (0.6) and 3.2 (0.5), respectively], and B cell depletion was observed for all [B cells at baseline, 6 months and 12 months, mean (S.E.M.): 108.5 (44.5), 16.4 (7.6) and 43.2 (13.9)]. Neither responders nor the non-responder patients expressed the *d393-cd20* mRNA before RTX administration or throughout the follow-up (five assessments: baseline and months 3, 6, 9 and 12) (Fig. 1). The *d393-cd20* mRNA was also not detected in synovial tissue samples from the five patients who required joint arthroplasty (Fig. 1). We then examined whether the *d393-cd20* mRNA could be expressed in patients who did not respond to RTX treatment in a larger population (second cohort). These patients were selected from the SMART study [4]: 24 subjects [21 female, mean age 57.6 years (S.E.M. 11.2), mean disease duration 8.7 years (S.E.M. 6.7), positive RF: 13/24; positive anti-CCP antibody: 13/24; mean (S.E.M.) DAS28 at baseline and 6 months: 5.8 (0.2) and 5.5 (0.2), respectively] were evaluated. Ethical approval was obtained by the Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière Ethics Committee. B-cell depletion was also observed in this cohort. Although *wt/fl-cd20* mRNA expression was always observed in these patients, again, no *d393-cd20* mRNA was detected, even with the sensitive qRT-PCR (Fig. 1).

This study shows that, in contrast to malignant B cells, circulating B cells and those present in the synovial tissue from RA patients do not express the *d393-cd20* transcript, regardless of their response to RTX. Presence of the D393-CD20 variant was associated with RTX resistance or loss of efficacy in patients with B cell malignancies. This result was not found in our RA patients. Since D393-CD20 was found to be expressed *in vitro* in EBV-transformed B-cell lines, EBV load was determined in our first RA cohort; it was found to be very low. No expression of D393-CD20 in B cells was detected in patients with pemphigus either [3]. Altogether, this means that the *d393-cd20* transcript is a molecular marker of B cell malignancies rather than of autoimmune diseases, and that the assessment of this transcript is not useful for monitoring RTX-treated RA patients.

Fig. 1 Alternative CD20 transcript variant expression in PBMCs and synovial tissue from patients with RA

Representative qualitative RT-PCR analysis of *wt/fl cd20* and *d393-cd20* transcripts performed on cDNA from PBMCs of a RA patient, sampled at baseline (BL) and 3, 6, 9 and 12 months after RTX treatment, from two synovial tissues sampled during arthroplasty and from five PBMC samples representative of the SMART cohort (non-responder RTX-treated patients). *fl/wt-cd20* PCR allowed amplification of both *fl/wt-cd20* and *d393-cd20* transcripts, whereas *d393-cd20* PCR amplified specifically the *d393-cd20* transcripts, using a primer spanning the splicing junction. H₂O was used as negative control and cDNA from a B-cell line (positive ctrl) was used as positive control. MW: 100 bp molecular marker. PBMC: peripheral blood mononuclear cells.

Rheumatology key message

- The alternative CD20 transcript is not a marker for resistance to rituximab in RA.

Funding: The French Agence Nationale de la Recherche (Labex LipSTIC, ANR-11-LABX-0021, InflammEX, ANR-10-LABX-00) and the Conseil Régional de Franche-Comté ('soutien au LabEX LipSTIC' 2014).

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

Clémentine Gamonet^{1,2,3}, Marina Deschamps^{1,2,3}, Sandrine Marion⁴, Georges Herbein^{5,6}, Gilles Chiocchia⁴, Isabelle Auger⁷, Philippe Saas^{1,2,3,8,9}, Christophe Ferrand^{1,2,3,8} and Eric Toussiot^{6,9,10,11,12}

¹INSERM, ²Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche Comté, ³Université de Franche-Comté, UMR1098, Besançon, ⁴INSERM U987, University Versailles Saint Quentin, Simone Veil Department of Health Science, Chronic Inflammation and Immune System, LabEX InflammEX, Montigny le Bretonneux, ⁵CHRU Besançon, Virologie, ⁶Université de Franche Comté, UPRES EA 4266 Agents Pathogènes et Inflammation, Besançon, ⁷INSERM, UMR1097, Université Aux Marseille, Marseille, ⁸Etablissement Français du Sang, Plateforme de Biomonitoring, LabEX LipSTIC, ⁹INSERM, CIC 1431, Centre investigation Clinique Biothérapie, ¹⁰Fédération Hospitalo-Universitaire INCREASE, CHRU, ¹¹CHRU Besançon, Rhumatologie and ¹²Université de Franche Comté, Département Universitaire de Thérapeutique, Besançon, France
Revised version accepted 24 April 2015
Correspondence to: Eric Toussiot, Clinical Investigation Center Biotherapy, INSERM, CIC-1431, University Hospital of Besançon, 25000 Besançon, France.
E-mail: etoussiot@chu-besancon.fr

References

- 1 Benucci M, Manfredi M, Puttini PS, Atzeni F. Predictive factors of response to rituximab therapy in rheumatoid

arthritis: what do we know today? *Autoimmun Rev* 2010;9:801–3.

- 2 Henry C, Deschamps M, Rohrich PS *et al.* Identification of an alternative CD20 transcript variant in B-cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance. *Blood* 2010;115:2420–9.
- 3 Gamonet C, Ferrand C, Colliou N *et al.* Lack of expression of an alternative CD20 transcript variant in circulating B cells from patients with pemphigus. *Exp Dermatol* 2014;23:66–7.
- 4 Mariette X, Rouanet S, Sibilia J *et al.* Evaluation of low-dose rituximab for the retreatment of patients with active rheumatoid arthritis: a non-inferiority randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1508–14.

Rheumatology 2015;54:1745–1747

doi:10.1093/rheumatology/kev247

Advance Access publication 9 July 2015

High incidence of cancer in anti-small ubiquitin-like modifier activating enzyme antibody-positive dermatomyositis

SIR, The idiopathic inflammatory myopathies (IIMs) are a group of systemic autoimmune diseases that include PM and DM [1]. Several myositis-specific autoantibodies, which have been regarded as mutually exclusive, are associated with certain clinical forms of IIM.

Since autoantibodies to small ubiquitin-like modifier activating enzyme (SAE) in patients with DM were described [2, 3], a few studies on anti-SAE antibodies in DM have been published from Italy [4], Japan [5] and Hungary [6]. We analysed serum samples from 110 DM patients and 2 were found to be anti-SAE positive [7]. The frequency of anti-SAE antibodies in DM overall was 1.5–5.7%. Nearly all patients with anti-SAE antibodies had skin and muscle symptoms, and most of them had skin disease before the muscle disease; however, the clinical features of the patients with anti-SAE antibodies are

CD20 alternative splicing isoform generates immunogenic CD4 helper T epitopes

Le développement de nouveaux antigènes de tumeurs est fondamental pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-tumorales.

La protéine D393-CD20 étant exclusivement exprimée dans les lymphocytes B malins ou transformés par l'EBV, elle semble une cible antigénique intéressante. Aussi il a été décidé d'évaluer la possibilité de développer une stratégie d'immunothérapie anti-tumorale ciblant D393-CD20.

Les peptides immunogènes de D393-CD20 ont dans un premier temps été identifiés par méthode de biologie inverse. Puis, la présence in vivo de lymphocytes T spécifiques de ces peptides a été évaluée chez des patients souffrant de lymphomes B, ce qui a permis de démontrer l'existence d'un répertoire TCD4 spécifique de D393-CD20 chez l'homme. Les clones isolés, de profil Th1 et Th17, se sont par ailleurs révélés en mesure de reconnaître des lignées B, signifiant un apprêtement naturel des peptides D393 immunogènes par les lymphocytes T. Enfin, un clone a été en mesure de reconnaître et lyser des lymphocytes B autologues.

Ces résultats confirment la possibilité d'utiliser D393-CD20 comme cible d'immunothérapie afin d'éliminer spécifiquement les lymphocytes B tumoraux. Peu d'épitopes restreints pour le CMH de classe II et dérivés d'antigènes tumoraux sont actuellement utilisés en clinique, malgré l'attention croissante accordée à leur identification. Il est cependant essentiel, au regard du rôle des LT CD4+ « helper » dans la mise en place d'une réponse antitumorale efficace, d'intégrer de tels épitopes dans les stratégies vaccinales anti-tumorales.

CD20 alternative splicing isoform generates immunogenic CD4 helper T epitopes

Charline Vauchy^{1,2,3}, Clementine Gamonet^{1,2,3}, Christophe Ferrand^{1,2,3}, Etienne Daguindau⁴, Jeanne Galaine^{1,2,3}, Laurent Beziaud^{1,2,3}, Adrien Chauchet⁴, Carole J. Henry Dunand⁵, Marina Deschamps^{1,2,3}, Pierre Simon Rohrllich^{1,2,6}, Christophe Borg^{1,2,3,7}, Olivier Adotevi^{1,2,3,7} and Yann Godet^{1,2,3}

¹INSERM UMR1098, F25020 Besançon cedex, France

²Université de Franche-Comté, F25020 Besançon cedex, France

³EFS Bourgogne Franche-Comté, F25020 Besançon cedex, France

⁴Department of Hematology, University Hospital of Besançon, F25020 Besançon cedex, France

⁵The Department of Medicine, Section of Rheumatology, The Knapp Center for Lupus and Immunology Research, The University of Chicago, Chicago, IL

⁶Department of Pediatrics, University Hospital of Besançon, F25020 Besançon cedex, France

⁷Department of Medical Oncology, University Hospital of Besançon, F25020 Besançon cedex, France

Cancer-specific splice variants gain significant interest as they generate neo-antigens that could be targeted by immune cells. CD20, a membrane antigen broadly expressed in mature B cells and in B cell lymphomas, is subject to an alternative splicing named D393-CD20 leading to loss of membrane expression of the spliced isoform. D393-CD20 expression is detectable in transformed B cells and upregulated in various lymphoma B cells. In this study, we show that D393-CD20 is translated in malignant B cells and that D393-CD20 specific CD4 T cells producing IFN- γ are present in B-cell lymphoma patients. Then, we have investigated whether the 20mer D393-CD20 peptide spanning the splicing site might be targeted by the immune system and we have shown that D393-CD20-specific CD4 Th1 clones could directly recognize malignant B cell lines and kill autologous lymphoma B cells indicating that D393-CD20-derived epitopes are naturally processed and presented on tumor cells. Finally, D393-CD20 peptide-based vaccination induced specific CD8 and CD4 T cell responses in HLA-humanized transgenic mice suggesting the presentation of D393-CD20 derived peptides on both HLA Class-I and -II. These findings support further investigations on the potential use of D393-CD20 directed specific immunotherapy in B cell malignancies.

The effective discovery of clinically relevant tumor antigens holds a fundamental role for the development of new diagnostic tools and anticancer immunotherapies. Generally, tumor antigens are classified as unique antigens derived from point mutations or as shared antigens. The shared antigens are further divided into tumor-specific antigens, differentiation antigens and overexpressed antigens. The prioritization of cancer antigens is based on criteria such as immunogenicity, specificity, oncogenicity.¹ One mechanism that would

lead to such priority targets could be alternative splicing. Alternative splicing can change the structure of mRNA by inclusion or skipping of exons, and this may alter the function, stability or binding properties of the encoded protein.² Aside from its role in physiological cell adaptation, alternative splicing has been shown to occur in human diseases, including cancer.³ Particularly, the splice variants differ between cancer and normal corresponding tissues.^{4,5} Cancer-specific splice variants are thus of significant interest as they may be involved in pathogenesis and may further potentially be used as biomarkers and generate novel targets for therapy. Because immune recognition of antigenic epitopes is highly specific, alternative exon splicing could provide the structural basis for expression of novel amino-acid sequences not subject to self repertoire tolerance.

We previously identified an alternative transcript of the B cell lineage membrane receptor CD20. This alternative transcript lacks 168 nucleotides within Exon 3 to 7 compared to the wild-type CD20 transcript and referred thereafter as D393-CD20.⁶ D393-CD20 translation gives rise to a protein lacking the extracellular domain and the most part of the four transmembrane-spanning domains and is, therefore, cytoplasmic. D393-CD20 mRNA is absent from normal resting B cells but present in various malignant or transformed B cells.⁶⁻⁸ Moreover, high expression of D393-CD20 protein

Key words: immunotherapy, B-cell lymphoma, CD20 antigen, CD4 T cells, splicing

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Grant sponsor: Ligue contre le cancer, the ICB network of the University of Franche-Comté, the Conseil Régional de Franche-Comté, the Agence Nationale de la Recherche (Labex LipSTIC, ANR-11-LABX-0021), the Fondation de France and the Etablissement Français du Sang (AO#2010)

DOI: 10.1002/ijc.29366

History: Received 22 Aug 2014; Accepted 18 Nov 2014; Online 28 Nov 2014

Correspondence to: Y. Godet, INSERM UMR1098, F25020 Besançon cedex, France, E-mail: yann.godet@univ-fcomte.fr

What's new?

Cancer-specific splice variants are generating interest as they may potentially be used as biomarkers and generate novel targets for therapy. Here, the authors investigate whether an alternative transcript of the B cell lineage membrane receptor CD20 could generate epitopes that are recognized by T lymphocytes and eligible as new targets for immunotherapy. They show that D393-CD20 generates promiscuous HLA-DR epitopes recognized by CD4 T cells, and that naturally occurring D393-CD20-specific T cells are present in B cell lymphoma patients. The findings support further studies on the modulation of D393-CD20-specific T cell response by Rituximab and the development of D393-CD20-specific immunotherapies.

has been found in malignant B cells of relapsed patients previously treated with the anti-CD20 therapeutic monoclonal antibody Rituximab.⁶ Therefore, we reasoned that the selective expression in leukemic B cells, as well as the expression of D393-CD20 in resistant lymphomas confers to this spliced mRNA the potential to be a tumor associated antigen. We thus investigated whether the D393-CD20 could generate epitopes recognized by T lymphocytes and eligible as new targets for immunotherapy.

Recent progresses on the fields of tumor immunology highlight the critical role of CD4 T helper cells in antitumor immunity.⁹ Among subsets of CD4 helper T cells (Th), Th1 lymphocytes, which mainly produce IFN- γ , control cell-mediated immunity against tumors. Particularly, recent evidence obtained in rodent models showed that tumor-specific CD4 T cells are indispensable for effective homing of effector T cells within the tumor.^{10,11} Then, it is of particular interest to identify new MHC Class II-restricted peptides (helper peptides) derived from relevant tumor antigens in order to actively target antitumor CD4 helper T cell response *in vivo*. The pivotal role of cancer specific helper peptides has also been reported in clinical trials showing effective antitumor T cell responses and clinical benefits when therapeutic cancer vaccines contain tumor-derived MHC Class II-restricted peptides.^{12,13}

In this study, we identify novel promiscuous D393-CD20-derived MHC Class II restricted epitopes that bind various HLA-DR alleles. IFN- γ -producing D393-CD20 specific CD4 T cell responses were detected in blood lymphocytes from lymphoma patients and D393-CD20 specific CD4 Th1 clones were capable to recognize both lymphoma cell lines and autologous lymphoma cells and to induce their apoptosis. In a preclinical model, D393-CD20-derived-peptide immunization induces specific CD4 T cells and also primes CD8 T cell responses against D393-CD20. Collectively, our results show that the splicing variant D393-CD20 is immunogenic and support the interest to stimulate or adoptively transfer D393-CD20-specific T cells.

Material and Methods**Peptide sequences**

The six peptides derived from D393-CD20_{28–47} (KPLFRR MSSLELVIAGIVEN), referred as KPL (KPLFRR MSSLEL VIA), PLF (PLFRRMSSLELVIAG), LFR (LFRMSSLEL

VIAGI), FRR (FRRMSSLELVIAGIV), RRM (RRMSSLEL VIAGIVE) and RMS (RMSLELVIAGIVEN) were predicted to bind multiples HLA molecules by using SYFPEITHI (www.syfpeithi.de), NetMHCpan 2.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/>) and NetMHCII 2.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>) software. Synthetic peptides (>80% purity) were purchased from ProImmune (Oxford, UK).

Cell lines

Human cell lines FaDu (-DRB1*04), Ramos (-DRB1*12, -DRB1*15), Daudi (-DRB1*07), SKW6.4 (-DRB1*13), MEC1 (-DRB1*07) and Pfeiffer were obtained from the DSMZ or ATCC cell banks. Jijoye and Raji cell lines (Human Burkitt Lymphoma) were provided by Diaclone (Besançon, France). Cells were maintained in RPMI 1640 or DMEM (Lonza, Paris, France) with 10% heat inactivated endotoxin free foetal calf serum added (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). For HLA-DR restriction analysis, FaDu cell line was treated with IFN- γ (100 UI/mL; Peprotech, Neuilly-Sur-Seine, France) for 48 hr before coculture with T cell clones at 1:1 ratio.

D393-CD20 expression in B cell lines

D393-CD20 expression was investigated by Western Blotting. Briefly, cells were lysed with sample buffer (2% SDS in 125 mM Tris HCl, pH 6.8). Proteins were extracted from 0.2×10^7 to 1×10^7 cells and by electrophoresis on 12.5% SDS-polyacrylamide gels and transferred to PDVF membranes (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The blots were then blocked for 1 hr in 6% milk before incubation with specific antibody against human CD20 (rabbit anti-human CD20 specific to the COOH-terminal region, Spring Bioscience, Pleasanton, CA). Blotted proteins were detected and quantified on a bioluminescence imager and BIO-1D advanced software (Vilber-Lourmat, France) after incubating blots with a horseradish peroxidase-conjugated appropriate secondary antibody (Beckman Coulter, Villepinte, France). The exposure time was longer for D393-CD20 detection than for CD20 and actin due to difference in the protein quantity.

***In vitro* generation of D393-CD20-specific CD4 T-cell lymphocytes**

Peripheral blood was obtained from clinical trial for patients or from a blood bank for healthy patients. Informed consent

for functional tests and genetic analysis was obtained from patients and healthy donors and this study was approved by the local ethic committee of Besançon hospital. To evaluate the presence of memory D393-CD20 specific T cell response, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from cancer patients were isolated by density centrifugation on Ficoll-Hyperpaque gradients (Sigma-Aldrich) and plated at 2.10^5 cells per well in a 96-well plate in RPMI 8% human serum with 10 $\mu\text{mol/L}$ of D393-CD20 20mer peptide. Recombinants interleukin (IL) 7 (5 ng/mL; Peprotech) and IL-2 (50 UI/mL; Novartis, Rueil-Malmaison, France) were added at Days 1 and 3, respectively. After 10 days of cell culture, the presence of D393-CD20 specific T cells was investigated by intracellular cytokine staining after a 10 $\mu\text{mol/L}$ peptide stimulation. To evaluate the presence of a D393-CD20 specific T cell repertoire in healthy donor's PBMC, a different protocol was used with the adjunction of 20mer peptide at Day 7 and IL-2 at Day 10. The intracellular staining was performed at Day 14 after the first peptide stimulation.

D393-CD20 T-cell clones isolation and B lymphoma cell recognition

T-cell clones were isolated by limiting dilution and amplified after stimulation by PHA in presence of irradiated allogenic PBMCs, B-EBV cell line and 150 UI of IL-2 as previously described.¹⁴ Functional analyses of specific CD4 T-cell clones were done by using intracellular IFN- γ staining, IFN- γ ELISA (Diacclone) and Human Ten-plex cytokines assay (Human Th1/Th2/Inflammation Diaplex; Diacclone). Th0 cells were isolated using the naïve CD4 T cell isolation kit II (Miltenyi Biotec, Paris, France). For lymphoma cell recognition, a patient's derived D393-CD20 CD4 T cell clone was cocultured with B-cell lines or autologous PBMC at 1:1 or 2:1 ratio respectively. Supernatants from T-cell clones and B-cell lines coculture were collected after 18 hr for cytokines detection. Control CD4 T cells were selected using the CD4 MicroBeads Kit (Miltenyi Biotec) and amplified as T-cell clones.

Flow cytometry analysis

For intracellular IFN- γ detection, cells were stimulated for 6 to 18 hr with or without 10 $\mu\text{mol/L}$ peptide, with 1 $\mu\text{L/mL}$ Golgi Plug (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France) before staining for flow cytometric analysis. Surface staining was performed using FITC (fluorescein isothiocyanate)-CD4 (clone B-A1), PE-CD8 (clone B-Z31, Diacclone) and Pacific Blue-CD3 (clone UCHT1, BD Biosciences), cells were then fixed and permeabilized using CytoFix/Perm Buffer (BD Biosciences) before staining with APC (allophycocyanin)-IFN- γ (clone B27, BD Biosciences). Samples were acquired on a FACS Canto II (BD Biosciences) and analyzed with the DIVA software. In antibody blocking experiments, anti-HLA-DR (clone L243) and anti-HLA-DP (clone B7/21) antibodies were used at 5 $\mu\text{g/mL}$. Chemokine receptors expression was investigated using APC-CCR6 (clone 11A9), PE-Cy7-CXCR3

(clone 1C6) and PE-CCR4 (clone 1G1, BD Biosciences). Positive staining was validated on healthy donor's PBMC (Supporting Information Fig. S1). For detection of Annexin V, cells were stained using APC-CD20 (clone 2H7, BD Biosciences) and PE-Kappa light chain (clone TB28-2, eBioscience, Paris, France). After transfer in binding buffer, V450-Annexin V and 7-AAD (BD Biosciences) were added.

Real-time PCR analysis

RNA was extracted using RNeasy Mini kit (Qiagen, Cergy-Pontoise, France) with RLT buffer (Qiagen) supplemented with β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Total RNA was subjected to reverse transcription (High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and quantified by real-time quantitative PCR using primer/probe sets listed as follows: *T-bet* (Hs00203436_m1), *Gata3* (Hs00231122_m1), *ROR γ T* (Hs01076112_m1), *FoxP3* (Hs01085834_m1) (Assay On Demand, Applied Biosystems). Real-time PCR were performed on the iCycler CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad, France). Relative expression for the mRNA transcripts was calculated using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method and *G6PDH* mRNA transcript as reference.

Mouse and vaccinations

The HLA-DRB1*0101/HLA-A*0201-transgenic mice (A2/DR1 mice) previously described were kindly provided by Pr François Lemonnier. Briefly, these mice are H-2 Class I and IA Class II knockout, and their CD8 T and CD4 T cells are restricted by the sole HLA-A*0201 and HLA-DR1*0101 molecules, respectively.^{11,15} For D393-CD20₂₈₋₄₇ (20mer) and D393-CD20₃₃₋₄₁ (9mer) immunization, mice were injected twice with 100 μg of D393-CD20 20mer or 50 μg of D393-CD20 9mer were emulsified in incomplete Freund adjuvant (IFA, Sigma-Aldrich). All peptide vaccinations were done subcutaneously at the base of the tail at Days 1 and 14. In some experiments, CD8 T cells were depleted with anti-CD8 monoclonal antibody treatment (500 μg , clone 2.43, BioXcell, West Lebanon, NH) before sacrifice. All protocols were performed according to the approval of the "Services Vétérinaires de la Santé et de la Protection Animale" delivered by the Ministry of Agriculture (Paris, France).

IFN- γ ELISPOT assay

Briefly, splenocytes from immunized mice (2.10^5 per well) were cultured in anti-mouse IFN- γ monoclonal antibody pre-coated ELISPOT plate with D393-CD20 20mer or 9mer (5 $\mu\text{mol/L}$) in X-VIVO medium (Invitrogen, Saint Aubin, France) for 18 hr at 37°C. In some experiments, CD8 T cells were selected using the CD8 α MicroBeads Kit (Miltenyi Biotec) before ELISPOT assay. Cells cultured with medium alone or phorbol-12-myristate-13-acetate (25 ng/mL; Sigma-Aldrich) and ionomycin (1 $\mu\text{g/mL}$; Sigma-Aldrich) were used as negative and positive controls, respectively. The IFN- γ spots were revealed following the manufacturer's instructions (Diacclone). Spot-forming cells were counted using the C.T.L.

Immunospot system (Cellular Technology). All the experiments were conducted in triplicates.

Results

D393-CD20 isoform protein expression and immunogenicity

To determine whether the D393-CD20 protein is frequently expressed in B cell malignancies, D393-CD20 protein expression was evaluated in various B cell lines. As shown in Figure 1a, D393-CD20 was expressed in B cell lines derived from patients with circulating lymphoblastic, marginal zone, Burkitt, mantle or diffuse large B cell lymphomas (Fig. 1a). As expected, we detected a signal at position 33 to 35 kDa, corresponding to the wild type CD20 protein isoforms (differentially phosphorylated),¹⁶ but also two additional bands at 15 to 17 kDa. The two bands at position 15 to 17 kDa may correspond to different phosphorylation states of the D393-CD20 protein.⁶ To assess its expression in primary lymphoma cells, we looked for D393-CD20 protein in peripheral blood lymphocytes of patient with circulating lymphoma cells. D393-CD20 protein expression was detected in five tested patient's PBMC and was absent in healthy donor's PBMC (Fig. 1b). This result confirms D393-CD20 as a lymphoma associated antigen. D393-CD20 is an in frame alternative spliced isoform of CD20. Thus, their amino acids sequences are similar excepting the lack of the CD20₃₇₋₉₂ region (Fig. 1c). Peptides overlapping the splicing site (position 37/38) are thus specific of D393-CD20 and could be used to stimulate lymphoma specific T cells (Fig. 1d).

To evaluate the presence of D393-CD20 specific T cell in the human repertoire, the D393-CD20₂₈₋₄₇ 20mer-peptide overlapping the splicing site was used to stimulate T cells. For this purpose, peripheral blood lymphocytes of healthy volunteers were *in vitro* stimulated twice using 10 µmol/L of D393-CD20₂₈₋₄₇ in 96 well microplates during 14 days as described in the material and method section. The presence of specific CD4 T cells was assessed using IFN-γ intracellular staining after peptide stimulation. D393-CD20-specific CD4 T cell responses were detected in four out of six healthy donors (Fig. 1e) and frequencies of positive microcultures were 14/96, 10/96, 3/96 and 8/96 for the four positive healthy donors with specific CD4 T cell frequencies ranging from 1 to 18.5%.

We then evaluated the presence of D393-CD20 specific T cell responses in lymphoma patients (Supporting Information Table I). Ficoll-isolated blood lymphocytes from eight patients were stimulated once (10 days) with the D393-CD20₂₈₋₄₇ peptide, and specific CD4 T cell responses were measured by IFN-γ intracellular staining. D393-CD20 specific CD4 T cell responses were detected in six out of the eight patients tested (Fig. 1f). For the six patients, frequencies of positive microcultures were 6/96, 4/96, 1/36, 6/96, 2/96 and 9/96 with IFN-γ positive CD4 T cell frequencies ranging from 1 to 6.9%. Thus a D393-CD20 specific CD4 T cell is present in peripheral T cell repertoire of lymphoma patients.

Characterization of HLA-DR restricted D393-CD20 specific CD4 T cells

To further characterize these responses, we derived D393-CD20₂₈₋₄₇-specific CD4 T cell clones by limiting dilution from patients' lymphocyte cultures as previously described (Godet *et al.*, 2012). We successfully derived CD4 specific T cell clones from two patients P#1 (P1.4 and P1.17) and P#7 (P7.10). These CD4 T cell clones were strongly reactive in the presence of cognate peptide and showed a half-maximal IFN-γ secretion at peptide concentration ranging from 30 ng/mL (13 nM) to 150 ng/mL (66 nM; Fig. 2a). Of note, these clones were strictly D393-CD20 specific as they did not recognize the CD20 peptide overlapping this sequence (Fig. 2b).

Next, we determined the HLA Class II restriction of D393-CD20-specific CD4 T cell clones. As shown in Figure 2c, D393-CD20₂₈₋₄₇ peptide recognition by all these T cell clones was inhibited in presence of HLA-DR blocking antibodies indicating their HLA-DR restriction (Fig. 2c). To further investigate the promiscuous HLA-DR binding capacity of D393-CD20₂₈₋₄₇ peptide and the degeneracy of T cell recognition, the reactivity of the CD4 T cell clones was evaluated against various HLA-DR-positive and D393-CD20-negative loaded with the D393-CD20₂₈₋₄₇ peptide. CD4 T cell clones from patient P#1 (HLA-DRB1*04 homozygote) and patient P#7 (HLA-DRB1*04 and -DRB1*11) were reactive against the HLA-DRB1*04 positive cell line FaDu loaded with the cognate peptide (Fig. 2d).

Investigations have well-documented that the nature of the Th epitope presented to the TCR is the first signal for the differentiation of a naïve Th cell into a specific Th phenotype.¹⁷ However, D393-CD20₂₈₋₄₇ specific CD4 T cell clones isolated from patient P#1 exhibited a CXCR3⁺, CCR6⁺ and CCR4⁻ phenotype (Fig. 3a) and expressed both the transcription factors T-bet and RORγT that are associated with a Th1/Th17 profile whereas the CD4 T cell clone isolated from the patient P#7 was CXCR3⁺, CCR6⁻, CCR4⁻ and expressed T-bet, that is, associated with a Th1 profile (Fig. 3b). All these clones produced high amount of Th1 associated cytokines such as IFN-γ, TNF-α and IL-2 but only P1.4 and P1.17 produced IL-17 in accordance with their molecular patterns (Fig. 3c).

D393-CD20 specific CD4 T cell clones recognize malignant HLA-DR+ B cells

Natural D393-CD20-derived peptide processing was evaluated by a coculture of the CD4 T cell clones with HLA-DR⁺ D393-CD20⁺ cell lines (Fig. 4a). P1.4 and P1.17 CD4 T cell clones were able to recognize SKW6.4 cells (HLA-DRB1*13) and P7.10 recognized HLA-DRB1*07 positive Daudi cells (Fig. 4a). The HLA-DR restriction of these responses was confirmed using HLA-DR blocking antibodies (Fig. 4a). These results suggested that these CD4 T cell clones were alloreactive or were able to recognize the D393-

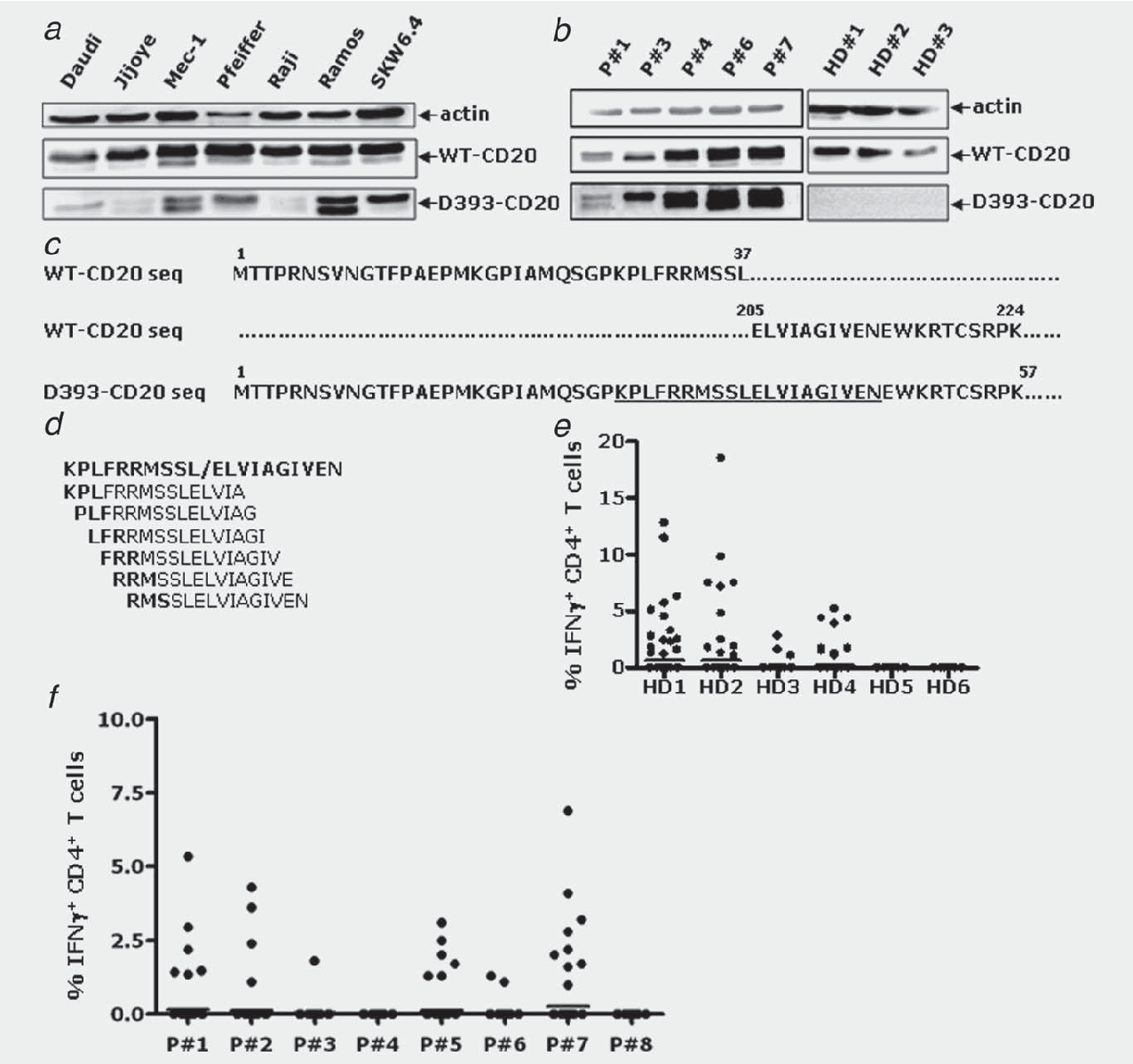


Figure 1. D393-CD20 expression and T cell specific repertoire. Western blot analysis, after denaturing acrylamide electrophoresis, with anti-C-term CD20 antibody of whole-cell lysates from B-cell lines (*a*) and from PBMC of patients (P#) or healthy donors (HD#) (*b*). A signal at position 33 to 35 kDa, corresponding to the WT-CD20 protein isoforms and two additional bands at 15 to 17 kDa corresponding to different post-translational modifications of the D393-CD20 protein could be detected. The exposure time was longer for D393-CD20 detection than for CD20 and actin due to difference in the protein quantity. Data are representative of at least three independent experiments. Sequence alignment of amino-acids preceding or following splice donor and acceptor sites respectively of CD20 and D393-CD20 (*c*). Peptides spanning the splice site used for epitope-mapping studies (*d*). The three first amino-acids used to name these peptides are indicated in bold-face. T cell lines were obtained from healthy donors' PBMCs after two rounds of *in vitro* stimulation in microplates with 10 µg/mL of D393-CD20_{28–47} peptide. Specific responses were assessed by CD4 and IFN-γ staining. A microculture was considered as positive when (*i*) the fraction of IFN-γ producing T cells was twofold higher upon peptide stimulation than unstimulated, (*ii*) and higher than 1% of CD4 T-cell after deducting the background. The bars represent the mean of the CD4 T cell responses in the microcultures (*e*). T cell lines were obtained from PBMCs of patients with B-cell lymphomas cultured with 10 µg/mL of D393-CD20_{28–47} peptide during 10 days, and specific responses in microcultures were assessed by CD4 and IFN-γ staining (*n* = 96 microcultures for patients 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 and *n* = 36 microcultures for Patient 3) (*f*).

CD20_{28–47} peptide in different HLA Class II contexts as it has been previously reported for other CD4 T cells.^{18–21} As P7.10 did not recognized the HLA-DRB1*07 positive MEC-1 cell line (Fig. 4a) and P1.4 and P1.17 did not recognized a HLA-DRB1*13 melanoma cell line (Data not shown), the alloreactivity of these D393-CD20 specific T cell clones was

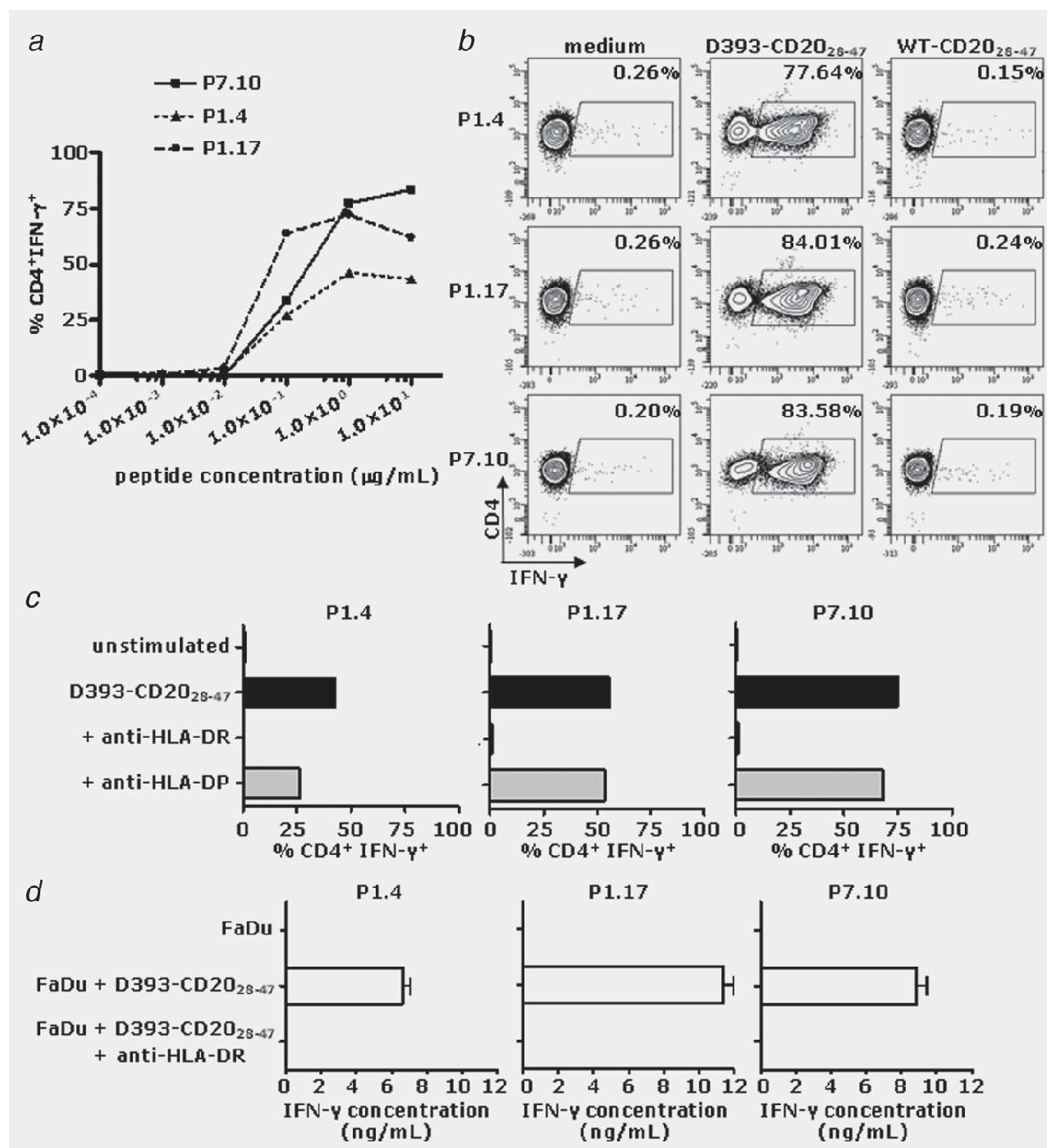


Figure 2. Functional characterization of D393-CD20-specific CD4 T cell clones. D393-CD20-specific CD4 T cell clones isolated from B-cell lymphoma patients were stimulated 6 hr with a range of D393-CD20₂₈₋₄₇ peptide concentration and their reactivity was assessed by IFN-γ intracellular staining (a). CD4 T-cell clones were stimulated by D393-CD20 or CD20 derived peptides for 6 hr and their reactivity was assessed by IFN-γ intracellular staining (b). D393-CD20 specific T-cell clones were stimulated with D393-CD20₂₈₋₄₇ peptide (10 μg/mL) in presence of 5 μg/mL of anti-HLA-DR (L243) or HLA-DP (B7/21) blocking antibodies and their reactivity was assessed by IFN-γ intracellular staining (c). HLA-class-II-positive cell line FaDu was loaded with the D393-CD20 derived peptide and CD4 T cell clones reactivity was assessed in an IFN-γ ELISA (d). Data are representative of three independent experiments.

rule out. These results indicate the natural processing of D393-CD20 on HLA-DR molecules by malignant B-cell lines.

To identify the minimal epitope recognized within the specific sequence of D393-CD20, we tested the reactivity the CD4 T cell clones against the six 15mer peptides derived

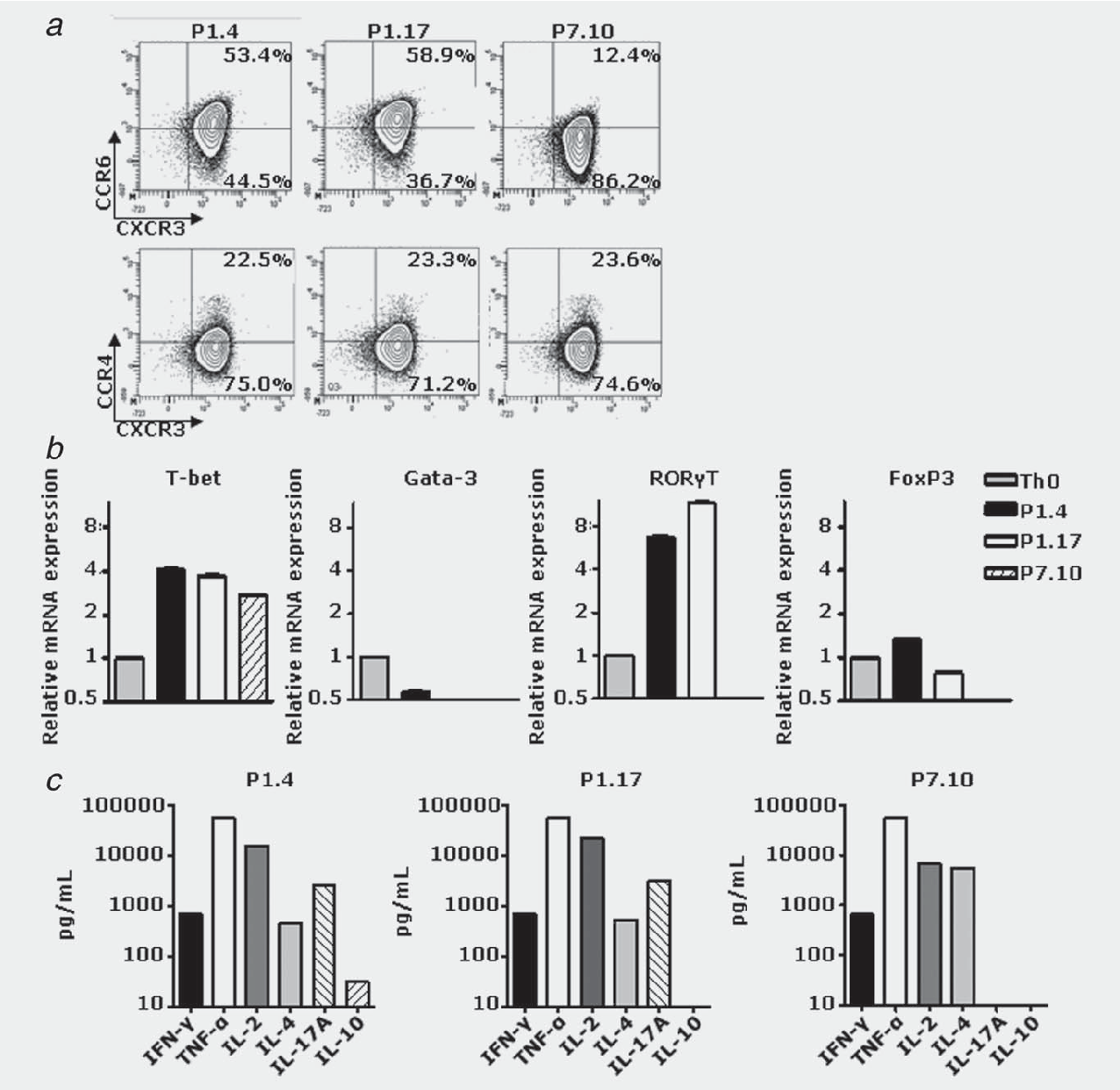


Figure 3. Polarization of D393-CD20-specific CD4 T cell clones. CXCR3, CCR6 and CCR4 expression on resting D393-CD20 specific T cell clones was assessed by flow cytometry (a). Quantitative reverse transcriptase–PCR analysis for master transcription factors associated with Th1, Th2, Th17 and Treg phenotypes was performed using mRNA isolated from resting T cell clones or naïve T CD4 cells isolated from a healthy donor (Th0). Mean \pm s.e.m. of gene expression levels are represented. Data are representative of two independent experiments performed in duplicate (b). Cytokines produced by D393-CD20-specific T cell clones in response to phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; 25 ng/mL) and Ionomycin (1 μ g/mL) stimulation were assessed using a human Ten-plex cytokines assay. Data represent the mean result from duplicate after background subtraction (c).

from the D393-CD20 specific sequence (Fig. 1d). On the one hand, the CD4 T cell clone isolated from the patient P#7 needed the proline (Pro₂₉) and the alanine (Ala₄₂) meaning that the 13mer peptide (PLFRMSSELVIA) would be the minimal epitope recognized (Fig. 4b). On the other hand, CD4 T cells clones isolated from the patient P#1 required the leucine (Leu₃₀) and the alanine (Ala₄₂) meaning that the 12mer peptide

(LFRMSSELVIA) would be the minimal epitope recognized (Fig. 4b). Nonetheless as all of these clones recognized a series of D393-CD20 derived peptides, we cannot formally assess that the shortest ones will be the exact peptides naturally presented by HLA-DR molecules on B cell lymphoma cells.

As effector CD4 T cells have also been shown to exert direct cytotoxicity against tumor cells,^{22,23} we further



Tumor Immunology

Tumor Immunology

Tumor Immunology

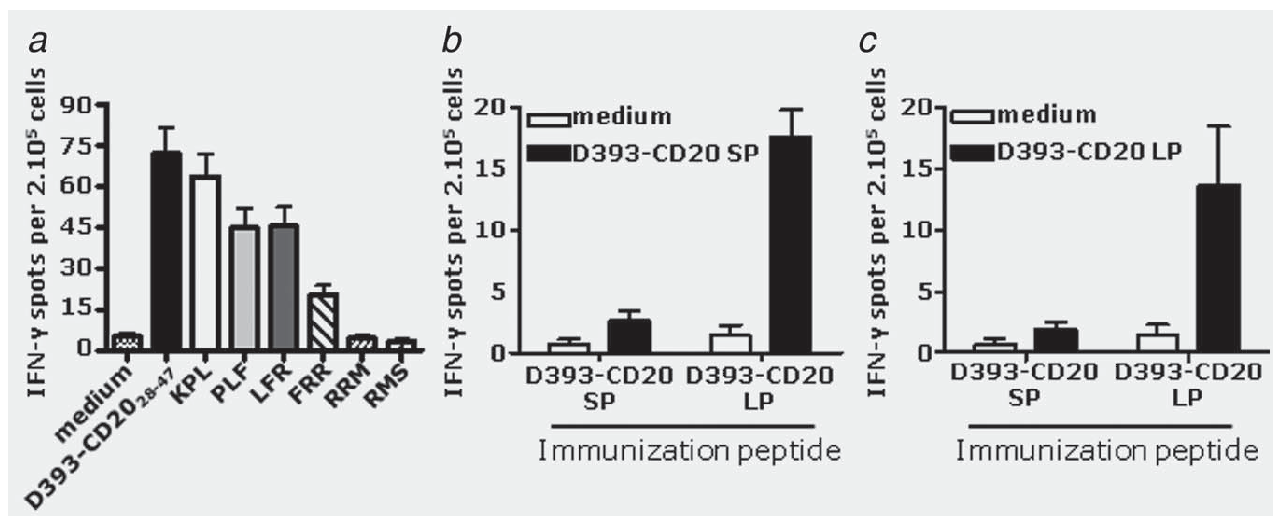


Figure 5. Vaccination with D393-CD20 derived long peptide induces both CD8 and CD4 T cells priming. HLA-A2/HLA-DR1 transgenic mice immunized with D393-CD20₂₈₋₄₇ were CD8 T cells depleted with 500 μ g of CD8 clone 2.43 and splenocytes were stimulated with D393-CD20 derived peptides and their reactivity was assessed *ex vivo* in an IFN- γ ELISPOT (a). D393-CD20₃₃₋₄₁ (SP) specific T cell recognition after D393-CD20 SP or D393-CD20 LP vaccination was assessed *ex vivo* on sorted CD8 T cells (b). D393-CD20₂₈₋₄₇ (LP) specific T cell recognition after D393-CD20 SP or D393-CD20 LP vaccination was assessed *ex vivo* on CD8 T cells depleted splenocytes in an IFN- γ ELISPOT (c). Five mice per group were used in each experiment.

shown in Figure 4c, higher percent of B cell lymphoma apoptosis was found in presence of P1.17 than in presence of autologous irrelevant control CD4 T cells (59% vs. 18.3%; Fig. 4c). This specific recognition was also assessed by TNF- α secretion during the coculture experiment (Fig. 4d). Together, these results show a cytolytic activity of D393-CD20-specific CD4 T cell clone and also support the natural processing of D393-CD20-derived MHC Class II epitopes on B lymphoma cells.

D393-CD20-derived peptide vaccination stimulates both specific CD4 and CD8 T cells in HLA-A2/HLA-DR1 transgenic mice

To assess the capacity of the 20mer long peptide D393-CD20₂₈₋₄₇ (LP) to prime a specific T cell response *in vivo*, we performed a peptide immunization in HLA-A2/HLA-DR1 transgenic mice and specific T cell responses were measured by *ex vivo* IFN- γ ELISPOT assay. As shown in Figure 5a, specific CD4 T cell responses were induced *in vivo* against the D393-CD20₂₈₋₄₇ LP and against four of the six D393-CD20 derived 15mer peptides supporting that these peptides effectively binds to HLA-DR1 molecules. Previous studies indicate that the use of synthetic long peptides can induce more effective cytotoxic T cell (CTL) responses than minimal MHC Class I restricted peptide-based vaccine.²⁴ We then evaluated the capacity of the D393-CD20₂₈₋₄₇ long peptide (LP) to prime HLA-A2-restricted CTL response. To this end, mice were immunized either with the D393-CD20₂₈₋₄₇ LP or with the HLA-A2-restricted D393-CD20 derived short peptide D393-CD20₃₃₋₄₁ (SP). As shown in Figure 5b, higher IFN- γ producing specific-CTL were detected *ex vivo* after

immunization with the D393-CD20₂₈₋₄₇ LP than with the SP. This could be related to the help provided by the D393-CD20₂₈₋₄₇-specific CD4 T cells simultaneously induced *in vivo* (Fig. 5c). Collectively, these results suggest that after uptake of D393-CD20₂₈₋₄₇, antigen presenting cells could simultaneously prime D393-CD20-specific CTL and CD4 T cell responses *in vivo*.

Discussion

Recent reports have shown that a cancer antigen could be processed into different variants as the result of RNA alternative splicing.^{25,26} Alternative splicing can change the structure of mRNA by inclusion or skipping of exons, and this may alter the function, stability or binding properties of the encoded protein.² Cancer-specific splice variants are thus of significant interest as they could be involved in pathogenesis and may further potentially be used as biomarkers and generate novel targets for therapy. The new amino-acid sequences generated in that case have previously shown to be potentially immunogenic.^{27,28} Moreover, some of these epitopes produced by cancer-related alternative splicing are recognized by specific CD8 T cells²⁹⁻³² or CD4 T cells³³ from cancer patients. The presence of candidate antigens derived from alternative splicing has however never been described in B cell lymphomas.

In this study, we identified promiscuous HLA-DR epitopes derived from the D393-CD20 splice variant of the MS4A1 gene. Even if CD4 T cells are not considered to recognize MHC-II expressing cancer cells efficiently, direct recognitions of B cell lymphomas by D393-CD20 specific CD4 T cell clones have been observed. Particularly antitumor activity of

D393-CD20 specific CD4 T cells has been assessed on autologous lymphoma B cells. Such direct tumor recognition by CD4 T cells has nevertheless already been reported for many tumor antigens and may be dependent of the epitope recognized.^{34,35} This is the first demonstration of the immunogenicity of D393-CD20 and of the presence of spontaneous D393-CD20 specific CD4 T cell responses in patients with B cell malignancies.

Different subpopulations of CD4 T helper lymphocytes regulate the antitumor response³⁶ and Th1 immunity has a clear positive effect in cancer cell eradication while the role of Th17 cells is still controversial and seems to depend on the type of cancer. It is now clear that Th17 could convert toward a Th1 like phenotype (See review³⁷). For instance, Th17 cells specific for the cancer testis antigen MAGE-A3 isolated from a patient with lung cancer were readily converted into IFN- γ -secreting Th1-like effectors.³⁸ In this study, according to the secretion, chemokine receptors and transcription factor expression profiles, we have isolated both Th1 and Th1/Th17 D393-CD20 specific T cell clones and IFN- γ -secreting D393-CD20-specific T cells were detected in B cell lymphoma patients suggesting the presence of an active antitumor CD4 T cell response. However, even if Signal 1 influences the CD4 T cell polarization^{39,40} we could not exclude the presence of D393-CD20 with other polarization as we have not addressed the presence of Th2 or Treg polarized D393-CD20 specific T cell responses.

HLA-DR restriction of the D393-CD20 specific CD4 T cell response was assessed by HLA-DR-blocking antibody experiments, and interestingly HLA-DR alleles of recognized B cell lines were not shared. These results are in line with previous studies showing that several human T cells are able to recognize different peptides in the context of one or several restriction elements.^{18–21} This result supports the promiscuous nature of D393-CD20 and of the TCRs expressed by these CD4 T cell clones. In this study, significant frequencies of IFN- γ -secreting D393-CD20-specific T cells were

detected in patients with B cell malignancies but also in healthy donors. One explanation of the presence of D393-CD20 specific responses in healthy donors could be explained by the expression of D393-CD20 in EBV infected B cells.⁶ Thus, the D393-CD20 specific response could be both an antiviral and an antitumor immune response. However, we have not compared the presence of this response in EBV positive and in EBV negative donors.

Recent studies have shown that vaccines containing natural CTL epitopes included in long peptides were superior to those comprising minimal CTL epitopes because of long-lasting cross-presentation of the longer peptides.^{41,42} We showed that D393-CD20_{28–47} was superior to D393-CD20_{33–41} to stimulate D393-CD20 specific CTLs in HLA-A2/HLA-DR1 transgenic mice. However, we did not observe spontaneous HLA-A2 restricted D393-CD20 specific CTL responses in human. Therefore, we are not able to conclude that using D393-CD20_{28–47} would lead to D393-CD20 specific CTL responses in human. Analyzing cancer data sets which included lymphoblastic and Burkitt lymphomas (The Alternative Splicing and Transcript Diversity database⁴³), Stranzl *et al.* have shown that alternative splicing in cancer cell is associated with the loss of epitopes restricted by frequently expressed HLA Class I compared to splicing in normal tissue.⁴⁴ This observation is also present here since the CD20_{188–196} previously described⁴⁵ HLA-A2 restricted epitope is absent from the D393-CD20 alternative spliced protein missing the CD20_{37–204} region.⁶

In conclusion, we have shown that the D393-CD20 splice variant generates promiscuous HLA-DR epitopes recognized by CD4 T cells and that naturally occurring D393-CD20 specific Th1 and Th1/Th17 antitumoral cells are present in B cell lymphoma patients. These findings support further studies on the modulation of D393-CD20 specific T cell response by Rituximab treatment and the development of D393-CD20 specific immunotherapies in B cell malignancies.

References

- Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 2009;15:5323–37.
- Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 2003;17:419–37.
- Kaida D, Schneider-Poetsch T, Yoshida M. Splicing in oncogenesis and tumor suppression. *Cancer Sci* 2012;103:1611–6.
- Gardina PJ, Clark TA, Shimada B, et al. Alternative splicing and differential gene expression in colon cancer detected by a whole genome exon array. *BMC Genomics* 2006;7:325.
- He C, Zuo Z, Chen H, et al. Genome-wide detection of testis- and testicular cancer-specific alternative splicing. *Carcinogenesis* 2007;28:2484–90.
- Henry C, Deschamps M, Rohrlach P-S, et al. Identification of an alternative CD20 transcript variant in B-cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance. *Blood* 2010;115:2420–9.
- Gamonet C, Ferrand C, Colliou N, et al. Lack of expression of an alternative CD20 transcript variant in circulating B cells from patients with pemphigus. *Exp Dermatol* 2014;23:66–7.
- Small GW, McLeod HL, Richards KL. Analysis of innate and acquired resistance to anti-CD20 antibodies in malignant and nonmalignant B cells. *PeerJ* 2013;1:e31.
- Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev* 2008;222:129–44.
- Bos R, Sherman LA. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res* 2010;70:8368–77.
- Dosset M, Godet Y, Vauchy C, et al. Universal cancer peptide-based therapeutic vaccine breaks tolerance against telomerase and eradicates established tumor. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2012;18:6284–95.
- Aarntzen EHJG, De Vries IJM, Lesterhuis WJ, et al. Targeting CD4(+) T-helper cells improves the induction of antitumor responses in dendritic cell-based vaccination. *Cancer Res* 2013;73:19–29.
- Slingluff CL Jr, Lee S, Zhao F, et al. A randomized phase II trial of multipitope vaccination with melanoma peptides for cytotoxic T cells and helper T cells for patients with metastatic melanoma (E1602). *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2013;19:4228–38.
- Godet Y, Fabre E, Dosset M, Lamuraglia M, et al. Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2012;18:2943–53.

15. Pajot A, Michel M-L, Fazilleau N, et al. A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice. *Eur J Immunol* 2004;34:3060–9.
16. Tedder TF, Schlossman SF. Phosphorylation of the B1 (CD20) molecule by normal and malignant human B lymphocytes. *J Biol Chem* 1988; 263:10009–15.
17. Pfeiffer C, Stein J, Southwood S, et al. Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. *J Exp Med* 1995;181:1569–74.
18. Doherty DG, Penzotti JE, Koelle DM, et al. Structural basis of specificity and degeneracy of T cell recognition: pluriallelic restriction of T cell responses to a peptide antigen involves both specific and promiscuous interactions between the T cell receptor, peptide, and HLA-DR. *J Immunol Baltim Md* 1950 1998;161:3527–35.
19. Mycko MP, Waldner H, Anderson DE, et al. Cross-reactive TCR responses to self antigens presented by different MHC class II molecules. *J Immunol Baltim Md* 1950 2004;173:1689–98.
20. Hennecke J, Wiley DC. Structure of a complex of the human alpha/beta T cell receptor (TCR) HA1.7, influenza hemagglutinin peptide, and major histocompatibility complex class II molecule, HLA-DR4 (DRA*0101 and DRB1*0401): insight into TCR cross-restriction and alloreactivity. *J Exp Med* 2002;195:571–81.
21. Maccalli C, Li YF, El-Gamil M, et al. Identification of a Colorectal Tumor-Associated Antigen (COA-1) Recognized by CD4+ T Lymphocytes. *Cancer Res* 2003;63:6735–43.
22. Guo Y, Niiya H, Azuma T, et al. Direct recognition and lysis of leukemia cells by WT1-specific CD4+ T lymphocytes in an HLA class II-restricted manner. *Blood* 2005;106:1415–8.
23. Akhmetzyanova I, Zelinsky G, Schimmer S, et al. Tumor-specific CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eliminate virus-induced tumor cells in the absence of regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother CII* 2013;62:257–71.
24. Bijker MS, van den Eeden SJF, Franken KL, et al. CD8+ CTL priming by exact peptide epitopes in incomplete Freund's adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity. *J Immunol Baltim Md* 1950 2007;179:5033–40.
25. Zhang L, Vlad A, Milcarek C, Finn OJ. Human mucin MUC1 RNA undergoes different types of alternative splicing resulting in multiple isoforms. *Cancer Immunol Immunother CII* 2013;62:423–35.
26. Lin J, Lin L, Thomas DG, et al. Melanoma-associated antigens in esophageal adenocarcinoma: identification of novel MAGE-A10 splice variants. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2004; 10:5708–16.
27. Kobayashi J, Torigoe T, Hirohashi Y, et al. Comparative study on the immunogenicity between an HLA-A24-restricted cytotoxic T-cell epitope derived from survivin and that from its splice variant survivin-2B in oral cancer patients. *J Transl Med* 2009;7:1.
28. Volpe G, Cignetti A, Panuzzo C, et al. Alternative BCR/ABL splice variants in Philadelphia chromosome-positive leukemias result in novel tumor-specific fusion proteins that may represent potential targets for immunotherapy approaches. *Cancer Res* 2007;67:5300–7.
29. Lupetti R, Pisarra P, Verrecchia A, v. Translation of a retained intron in tyrosinase-related protein (TRP) 2 mRNA generates a new cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined and shared human melanoma antigen not expressed in normal cells of the melanocytic lineage. *J Exp Med* 1998;188: 1005–16.
30. Guilloux Y, Lucas S, Brichard VG, et al. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J Exp Med* 1996;183:1173–83.
31. Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, et al. The intronic region of an incompletely spliced gp100 gene transcript encodes an epitope recognized by melanoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol Baltim Md* 1950 1997;159: 303–8.
32. Andersen RS, Andersen SR, Hjortso MD, et al. High frequency of T cells specific for cryptic epitopes in melanoma patients. *Oncoimmunology* 2013;2:e25374.
33. Slager EH, van der Minne CE, Krüse M, et al. Identification of multiple HLA-DR-restricted epitopes of the tumor-associated antigen CAMEL by CD4+ Th1/Th2 lymphocytes. *J Immunol Baltim Md* 1950 2004;172:5095–102.
34. Friedman KM, Prieto PA, Devillier LE, et al. Tumor-specific CD4+ melanoma tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunother Hagerstown Md* 1997 2012;35:400–8.
35. Matsuzaki J, Tsuji T, Luescher I, et al. Nonclassical antigen-processing pathways are required for MHC class II-restricted direct tumor recognition by NY-ESO-1-specific CD4(+) T cells. *Cancer Immunol Res* 2014;2:341–50.
36. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev* 2010;238:247–62.
37. Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* 2013;121:2402–14.
38. Hamai A, Pignon P, Raimbaud I, et al. Human T(H)17 immune cells specific for the tumor antigen MAGE-A3 convert to IFN-γ-secreting cells as they differentiate into effector T cells in vivo. *Cancer Res* 2012;72:1059–63.
39. Cecil DL, Holt GE, Park KH, et al. Elimination of IL-10-inducing T-helper epitopes from an IGFBP-2 vaccine ensures potent antitumor activity. *Cancer Res* 2014;74:2710–8.
40. Van Panhuys N, Klauschen F, Germain RN. T-cell-receptor-dependent signal intensity dominantly controls CD4(+) T cell polarization in vivo. *Immunity* 2014;41:63–74.
41. Speetjens FM, Kuppen PJK, Welters MJP, et al. Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2009;15:1086–95.
42. Melief CJM, van der Burg SH. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer* 2008;8: 351–60.
43. Koscielny G, Le Texier V, Gopalakrishnan C, et al. ASTD: The Alternative Splicing and Transcript Diversity database. *Genomics* 2009;93:213–20.
44. Stranzl T, Larsen MV, Lund O, et al. The cancer exome generated by alternative mRNA splicing dilutes predicted HLA class I epitope density. *PLoS One* 2012;7:e38670.
45. Bae J, Martinson JA, Klingemann HG. Identification of CD19 and CD20 peptides for induction of antigen-specific CTLs against B-cell malignancies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2005; 11:1629–38.

DONNEES NON PUBLIEES

Des travaux menés au laboratoire avaient suggéré une implication de l'expression de D393-CD20 lors de l'acquisition de résistance au Rituximab (RTX). Une expression accrue de D393-CD20 avait été constatée chez des patients en rechute de lymphomes traités par RTX (Henry et al., 2010), et l'expression augmentait également au cours de l'acquisition *in vitro* de résistance au RTX.

Les cas de résistances aux traitements par RTX sont fréquemment rapportés dans la littérature, sans que les causes en soient fermement connues. De nouveaux AcMo anti-CD20 ont été développés et continuent de l'être dans le but d'améliorer l'efficacité des thérapies basées sur la déplétion des LB. La compréhension des mécanismes de résistance permettrait une meilleure prise en charge thérapeutique des patients souffrant de pathologies impliquant les LB, dont les lymphomes B, leucémies ainsi que plusieurs maladies auto-immunes.

Dans ce cadre, il était important d'étudier l'expression de D393-CD20 en fonction de la sensibilité à plusieurs AcMo anti-CD20. Ainsi, ont été testés le RTX puisqu'il est le traitement de référence, mais également l'OFA et le GA101. Ces deux derniers ont été approuvés par la FDA en 2014 et 2013 pour le traitement de LLC. L'OFA serait particulièrement efficace pour le traitement de LLC réfractaires aux traitements conventionnels grâce à sa meilleure affinité pour CD20, et le GA101 montre une efficacité accrue lors du traitement de patients atteints de LLC et lymphomes B non préalablement traités.

La sensibilité de plusieurs lignées B à ces anticorps a été évaluée grâce à la mise en place de résistances *in vitro* et par le développement de modèles cellulaires exprimant de plus ou moins importantes quantités de D393-CD20.

Pour ce faire, des modèles de lignées résistantes au AcMo anti-CD20 ont été mises en place au laboratoire afin d'étudier l'expression de D393-CD20 en fonction de la sensibilité des cellules aux anticorps. La sensibilité de cellules B exprimant des quantités de D393-CD20 a également été évaluée.

Ces travaux ne nous ont pas permis de confirmer une implication directe de D393-CD20 sur la résistance au RTX : aucune augmentation d'expression de D393-CD20 dans les lignées résistantes n'a pu être observée de manière reproductible et significative, et la présence de D393-CD20 ne provoque pas directement de modulation de la sensibilité aux AcMo.

En revanche, le traitement de cellules B par RTX à des temps très précoces (en comparaison au modèle de mise en place de résistances *in vitro*, traité sur plusieurs semaines) montre une augmentation d'expression de la protéine D393-CD20. Cette observation a été constatée lors du traitement de lignées B, de PBMC de donneurs sains ou de PBMC de patients atteints de LNH. L'implication de la voie PI3K/AKT dans cette modulation de l'épissage de *cd20* par le RTX a été également constatée lors de ces expériences.

Nos travaux ont également mis en évidence une association entre WT-CD20 et D393-CD20 au niveau des radeaux lipidiques.

Si une implication directe de D393-CD20 dans la résistance aux AcMo anti-CD20 n'a pas été démontrée, les voies de signalisation en aval de CD20 mises en jeu lors de la fixation du RTX semblent moduler l'épissage de *cd20*.

I. Matériel et Méthodes

I.1 Echantillons biologiques, patients et lignées cellulaires

Les lignées cellulaires proviennent des banques ATCC et DSMZ et ont été cultivées en RPMI ou DMEM supplémenté avec 10% de SVF et 1% d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine, PS).

Les PBMC ont été isolés par gradient de densité sur Ficoll-Hyperpaque (Sigma Aldrich) à partir de sang total de donneurs de sang à l'Etablissement Français du Sang Bourgogne/Franche-Comté ayant tous consenti à ce que leur prélèvement soit utilisé à des fins de recherche.

I.2 Mise en place de lignées résistantes

Des lignées Raji, Ramos, Mec-1, SKW6.4 et Nalm6 ont été maintenues en culture avec des doses croissantes d'AcMo anti-CD20 de 2µg/ml à 64µg/ml (2, 8, 16, 32, 64µg/ml). Après 24H de traitement, le milieu a été remplacé par du milieu frais. L'opération a été répétée 3 fois avant d'utiliser une dose d'AcMo supérieure. La sensibilité directe à l'AcMo a été évaluée après traitement par 10µg/ml d'AcMo.

I.3 Traitements

Les lignées et PBMC isolés sont mis en culture 18h en présence de 10µg/ml de RTX (service d'oncologie de l'hôpital Minjoz, Besançon) additionné ou non de cross-linker (XL, rabbit anti-human IgG Fc, Sigma-Aldrich).

Les inhibiteurs et activateurs d'AKT et de PDK1 sont ajoutés à la culture 4H avant le traitement par RTX.

I.4 Etude biochimique : Western Blotting, Immunoprécipitation, Fractionnement Sub cellulaire et extraction des radeaux lipidiques

Extraction des radeaux lipidiques

Les cellules sont incubées sur glace dans 0.2ml d'une solution d'isolation (NaCl 150mM, Dithiothreitol 5mM, Tris-HCl 25mM pH7.4, pastille d'antiprotéases « Complete, Mini, EDTA-free », Roche, Allemagne, et 1% de Triton). Quatre cent µl d'Optiprep™ sont ajoutés dès la fin de l'incubation. Des gradients sont ensuite préparés par dilution de l'Optiprep avec la solution d'isolation et 600µl des différentes fractions sont déposées au-dessus des cellules.

Une ultra-centrifugation de 16H à 160000g à 4°C permet d'isoler les radeaux lipidiques, et les différentes fractions sont prélevées en vue d'une analyse en Western Blotting.

Fractionnement sub-cellulaire

Les cellules sont lysées en tampon hypotonique [HEPES 10Mm pH 7.9, MgCl₂ 1.5mM, KCl 10mM, DTT 1m, anti-protéases 1X pastille « Complete, Mini, EDTA-free », Roche, Allemagne), orthovanadate 1 mM (Sigma) et fluorure de sodium 1 mM (Sigma)]. Un tiers du volume de tampon de hypertonique est ajouté (HEPES 10Mm pH 7.9, MgCl₂ 1.5mM, NaCl 0.6M, KCl 10mM, DTT 1mM, anti-protéases 1X, orthovanadate 1 mM et fluorure de sodium NaF 1 mM). Après une centrifugation de 10min à 500g le culot de noyaux est conservé et le surnageant de membrane + cytosol est additionné d'EDTA qsp 5mM et centrifugé 1h à 100000g à 4°C. Le culot contient les membranes et le surnageant la fraction cytosolique.

Immunoprécipitation

Les cellules sont lysées en tampon doux de lyse (TRIS-HCl 50mM pH7.4, NaCl 100mM, glycérol 10%, NP40 0.2%, vanadate 1mM, NaF 1mM, EDTA 1mM antiprotéases 1x, DTT 1mM, H₂O qsp 1mL et incubées 30min sous agitation à 4°C.

Vingt µl de billes Dynabeads protein G (Dyna, ThermoFisher Scientific, USA) sont incubées avec 5µg d'anticorps anti-CD20 spécifique de la région extra-cellulaire de CD20 durant 2h à température ambiante. Vingt mg de protéines sont incubés avec 20µl de billes couplées à l'Ac (billes-Ac) et incubées 4h sous agitation à 4°C. Les billes sont éluées par capture magnétique après incubation à 70°C durant 5min. Les protéines sont ensuite analysées par Western blotting.

Western Blotting

Les cellules ont été lysées en tampon de lyse (2% SDS in 125mM Tris HCl, pH 6.8). Les protéines extraites ont été séparées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide (12%) et transférées sur une membrane de PVDF (Polyfluorure de vinylidène) (GE Healthcare). Les membranes ont été bloquées dans du lait à 6% pendant 1h avant d'être incubées durant une nuit à 4°C avec un anticorps anti-CD20 spécifique de la région C-ter (Thermo Scientifique) et un anticorps anti-actine (#8457L, Cell signaling) puis durant 1h à température ambiante avec un anticorps anti-Rabbit couplé à l'enzyme horseradish peroxydase (HRP). Les protéines ont été détectées et quantifiées grâce à une caméra et au logiciel Bio-1D (Vilber-Lourmat) après une brève incubation avec les substrats de l'HRP.

I.5 Etude moléculaire: Extraction de l'ARN, reverse transcription, PCR

L'ARN total a été extrait à partir du kit RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur.

Un µg d'ARN total a été utilisé comme matrice pour synthétiser l'ADNc en utilisant le kit RNA to cDNA high capacity (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France).

Les PCR qualitatives ont été réalisées en utilisant le mix prêt à l'emploi MyTaq DNA polymerase (Bioline, France) et des primers spécifiques. Les produits de PCR sont analysés par migration sur gel d'agarose 2% puis détection d'un agent intercalant de l'ADN par exposition aux rayons ultra-violet.

II. Résultats

II.1 La protéine tronquée D393-CD20 est associée avec WT-CD20 au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique.

L'étude des caractéristiques biochimiques de D393-CD20 nous ont permis de montrer une association entre WT-CD20 et D393-CD20. L'immunoprécipitation (IP) de WT-CD20 à l'aide d'un anticorps spécifique de la région extra-cellulaire de CD20, absente de D393-CD20, conduit à la révélation par WB de D393-CD20 (Fig 30-A). Des bandes additionnelles sont également observées, et correspondent aux tailles attendues des protéines potentiellement codées par les autres variants alternatifs, suggérant leur possible association avec WT-CD20.

Un fractionnement sub-cellulaire révèle la présence de D393-CD20 à la membrane malgré l'absence de la quasi-totalité des domaines transmembranaires de la protéine. Cette observation est également en faveur

d'une association entre WT- et D393-CD20 : lorsque la protéine tronquée est exprimée seule, elle est localisée dans le cytoplasme. C'est son association avec WT-CD20 transmembranaire qui semble à l'origine de sa localisation dans la fraction membranaire (Fig 30-B).

Par ailleurs, la présence de ces deux protéines au sein des microdomaines membranaires correspondant aux radeaux lipidiques (Fig 30-C) laisse penser à une implication dans les voies de signalisation cellulaires, largement dépendantes de ces microdomaines.

Au vu de ces résultats, et de ceux précédemment publiés (Henry et al., 2010) , nous avons suggéré que D393-CD20 pouvait empêcher l'action de WT-CD20 et avons souhaité étudié si cette hétérodimérisation pouvait être à l'origine de résistance aux RTX.

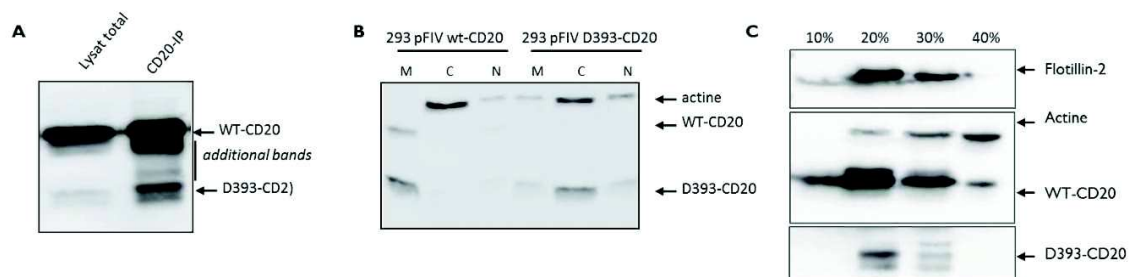


Figure 30: Western Blotting anti-CD20 après Immunoprécipitation (IP) anti-CD20, fractionnement sub-cellulaire et extraction des radeaux lipidiques

(A) Une IP de WT-CD20 par un anticorps spécifique de la région extra-cellulaire de CD20 révèle par WB anti-CD20 spécifique de la région C-terminale la présence de D393-CD20 (20kDa) associée à WT-CD20 (35kDa).

(B) Un fractionnement sub-cellulaire de cellules 293 transfectées par la séquence codante de wt-CD20 (pFIV wt-CD20) et celle de D393-CD20 (pFIV D393-CD20) permet de localiser D393-CD20 au sein de la fraction membranaire en présence de WT-CD20 et dans la fraction cytoplasmique en son absence.

(C) D393-CD20 est, tout comme WT-CD20, majoritairement présent dans les fractions correspondant aux radeaux lipidiques (2 et 3) caractérisées par la présence de flotilline-2 (47kDa). L'actine est ajoutée en contrôle de la quantité de protéines (43kDa).

II.2 Aucune corrélation ne peut être établie entre l'expression de D393-CD20 et l'acquisition de résistance aux AcMo.

La mise en culture de lignées B en présence d'AcMo anti-CD20 RTX, OFA et GA101 a permis d'obtenir des lignées résistantes caractérisées par une mortalité diminuée lors d'exposition aux AcMo en comparaison à la lignée sauvage (WT) maintenue en culture sans AcMo (Fig 31).

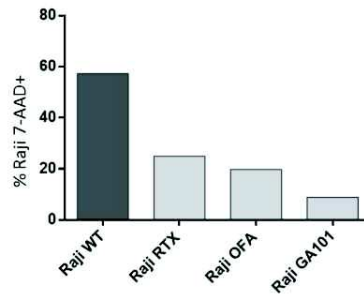


Figure 31: Sensibilité aux AcMo anti-CD20 des lignées résistantes. Exemple de la lignée Raji.

La sensibilité aux anti-CD20 de cellules Raji sauvages (WT) ou préalablement exposées aux anticorps anti-CD20 RTX, OFA et GA101 est évaluée par marquage 7-AAD+ après 30min d'exposition à 10µg/ml d'Ac.

Ce modèle nous a permis de comparer dans les lignées résistantes et sauvages l'expression de D393-CD20 à l'échelle protéique par WB et à l'échelle moléculaire par RT-qPCR. Ces expériences, menées sur 3 lignées cellulaires (Raji, Mec-1, SKW6.4) avec 3 AcMo anti-CD20 (RTX, OFA et GA101) n'ont pas montré de significative augmentation d'expression de D393-CD20 dans les lignées résistantes malgré la perte de sensibilité aux AcMo (Fig 32). Si une très légère augmentation est parfois observée comme c'est le cas sur l'exemple figure 32, cela n'est pas reproductible d'une expérience à l'autre et non corrélé aux variations de l'ARNm.

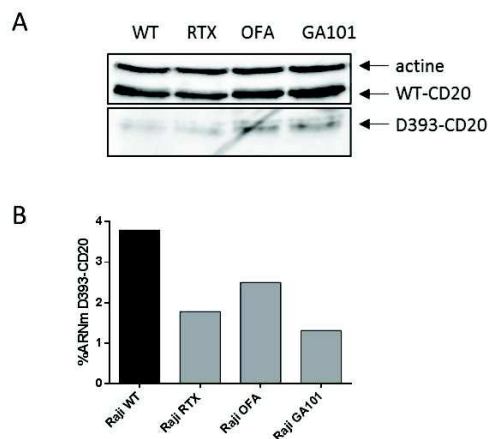


Figure 32: Expression de WT- et D393-CD20 par les lignées Raji sauvages (WT) et résistantes aux AcMo RTX, OFA et GA101

(A) WB anti-CD20 après acquisition de résistance au RTX, OFA et GA101 de cellules Raji. La lignée Raji sauvage (WT) est utilisée comme contrôle.

(B) RT-qPCR spécifique des ARNm D393 et WT-CD20. La proportion d'expression des ARNm D393 comparée aux formes totales (WT + D393) est calculée après quantification des variants D393 et WT-CD20.

L'étude de l'expression membranaire de WT-CD20 a par ailleurs montré une importante diminution d'expression de la protéine à la surface des lignées exposées aux AcMo (Fig 33). Cette diminution des cibles

explique la plus faible sensibilité aux AcMo des lignées résistantes, indépendamment d'une variation de l'épissage.

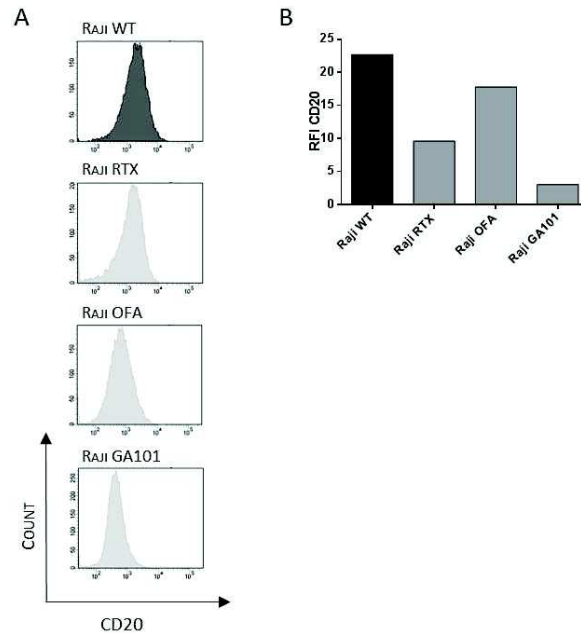


Figure 33: Expression de WT-CD20 à la surface des lignées Résistantes. Exemple de la lignée Raji

(A) L'expression de WT-CD20 à la surface des cellules est évaluée par marquage avec un anti-CD20 couplé au FITC.

(B) Le rapport d'intensité de fluorescence (RFI) est calculé en rapportant l'intensité de fluorescence en FITC des cellules marquées par CD20 à celle des cellules non marquées.

Des variations de la proportion de variant D393-CD20 ont été observées lors de la culture de plusieurs lignées B sans anticorps, et ce indépendamment des dilutions réalisées pour le maintien en culture (Fig 34).

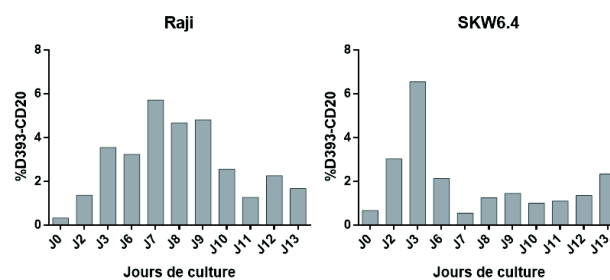


Figure 34: expression de D393-CD20 au cours de la culture

L'expression d'ARNm D393-CD20 est évaluée au cours d'une culture de lignée Raji et SKW6.4 par RT-qPCR.

II.3 Le traitement par RTX augmente l'expression de D393-CD20

Suite à l'observation selon laquelle les patients en rechute après traitement par RTX présentaient une expression accrue de D393-CD20, des cellules B ont été traitées *in vitro* par RTX afin d'étudier l'impact direct de ce traitement sur l'expression des protéines CD20.

Après 18H de traitement de PBMC de donneurs sains par RTX à 10µg/ml, une induction d'expression de D393-CD20 est constatée sur ces cellules initialement D393 négatives (Fig 36). Cet effet est accentué par l'addition d'un anti-IgG (XL).

Une importante diminution d'expression de WT-CD20 est également observée lors du traitement par RTX additionné ou non de XL.

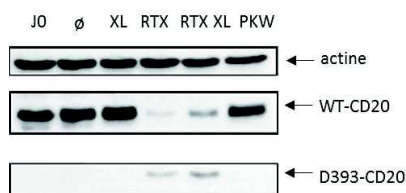


Figure 35: Expression de WT- et D393-CD20 après traitement de PBMC par RTX

Un WB anti-CD20 est réalisé après traitement de PBMC de donneurs sains par 10 µg/ml de RTX durant 18H additionné ou non d'anticorps secondaire anti-IgG Fc (XL). Les PBMC avant mise en culture (J0) et après 18H de culture en RPMI seul (Ø) sont déposés en contrôle. Un traitement par pokeweed (PKW) est utilisé comme contrôle d'activation des cellules B. L'actine est révélée en contrôle de la quantité de protéines déposées dans chaque puits.

La même observation est faite lors du traitement des lignées B D393-CD20 Ramos, Daudi et Mec-1 pour lesquelles l'expression de D393 est augmentée après traitement par RTX + XL. La présence de XL est dans ces cas nécessaire car le RTX seul montre peu d'effets. En revanche aucune augmentation d'expression de D393-CD20 n'est constatée lors du traitement de la lignée SKW6.4 (Fig 37). Contrairement à ce qui est constaté pour les PBMC, aucune diminution d'expression de WT-CD20 n'est observée après traitement par RTX.

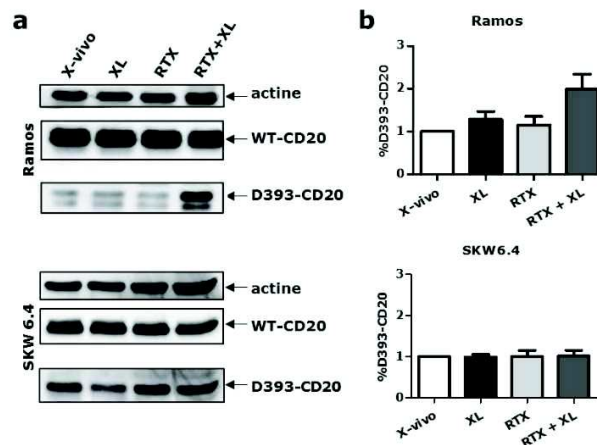


Figure 36: Expression de WT- et D393-CD20 après traitement de lignée B par RTX

(a) Un WB anti-CD20 est réalisé après traitement de lignées Ramos et SKW6.4 par 10 µg/ml de RTX durant 18H additionné ou non d'anticorps secondaire anti-IgG (XL). Les cellules en culture en milieu X-vivo seul (X-vivo) sont ajoutées en contrôle et l'actine est révélée en contrôle du dépôt de protéines.

(b) La quantification des protéines WT- et D393-CD20 est réalisée par mesure de la densitométrie des bandes. La proportion de D393 par rapport aux formes totales de CD20 est calculée.

Une des principales voies de signalisation en aval de CD20 est la voie PI3K/AKT. Afin de déterminer l'influence de cette voie sur l'expression de D393-CD20 en présence de RTX, la kinase AKT a été inhibée préalablement au traitement par RTX.

Cette inhibition semble abroger l'effet du RTX puisqu'une très faible expression de D393-CD20 a été observée après traitement par inhibiteur + RTX XL comparée à la condition RTX XL seul. A l'inverse, la seule présence d'un activateur de la phosphorylation d'AKT induit la même expression de D393 que le traitement par RTX XL. En présence de ces deux traitements, l'expression de D393 est largement augmentée (Fig 38).

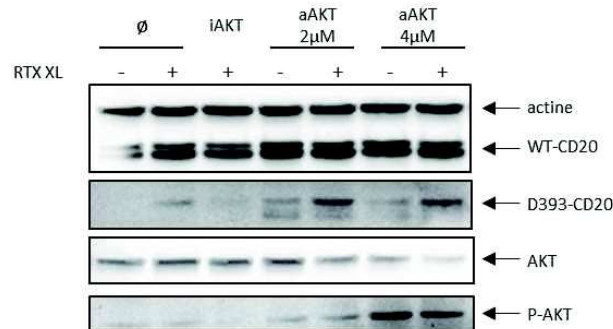


Figure 37: Expression de WT- et D393-CD20 après inhibition d'AKT préalable au traitement de PBMC par RTX

Un WB anti-CD20 est réalisé après traitement de PBMC par un inhibiteur d'AKT (iAKT) à 10µM ou un activateur d'AKT (aAKT) à 2 et 4 µM durant 4H, suivi de 18H de RTX à 10µg/ml. Le RTX est additionné d'anticorps secondaire anti-IgG Fc (XL) (+) ou non (-). Des cellules non traitées (Ø) sont ajoutées en contrôle et l'actine est révélée en contrôle du dépôt de protéines.

III. Discussion

Malgré la démonstration de l'existence d'une hétérodimérisation entre D393- et WT-CD20 au niveau de la membrane cellulaire et plus particulièrement dans les radeaux lipidiques, ces résultats ne permettent pas de confirmer l'hypothèse d'une implication directe de D393-CD20 dans la résistance aux AcMo anti-CD20. Si des modulations d'expression ont pu être constatées grâce au modèle d'acquisition de résistance en culture, elles sont hétérogènes, difficilement reproductibles et non significatives. La modulation de l'épissage constatée au cours de la culture permet d'expliquer en partie ces résultats. De plus, la présence d'une importante ou faible quantité de D393-CD20 n'influence pas la réponse aux AcMo comme démontré lors de la transduction de Nalm6.

En revanche, l'ensemble de ces résultats montre une modulation d'expression de D393-CD20 dans les premières heures suivant le traitement par RTX. L'implication de la voie PI3K/AKT, dont l'inhibition abroge et l'activation potentialise l'effet du RTX, suggère une transduction de signaux suite à la fixation du RTX sur la protéine CD20 impliquée dans l'épissage de *cd20*. Cette hypothèse est confortée par les variations d'expression de WT-CD20 lors du traitement de PBMC par le RTX : l'importante diminution d'expression de la forme sauvage de la protéine associée à l'expression de la forme tronquée pourrait résulter d'une modulation de l'épissage alternatif limitant son expression au profit de D393. Ce phénomène n'est pas observé lors du traitement de lignées B : peut-être est-il présent mais non visible par WB en raison de la très importante quantité de WT-CD20 naturellement présente dans les lignées.

Cette perte d'expression peut également être attribuée à la mortalité cellulaire induite par le traitement. Une déplétion des cellules B CD20+ pourrait mettre en évidence une population D393-CD20+ exprimant plus ou moins intensément le CD20 membranaire.

Les résultats constatés lors de l'inhibition de la voie AKT sont surprenants puisqu'il est montré dans la littérature que le RTX inhibe les voies de survie cellulaire dont PI3K/AKT, ce qui permet une sensibilisation des cellules à la mort cellulaire induite par les chimiothérapies (Suzuki et al., 2007). Mais des travaux publiés en 2013 montrent des effets du RTX différents en fonction de la composition en cholestérol des cellules traitées : les cellules riches en cholestérol subissent une phosphorylation d'AKT après traitement par RTX et donc une activation de cette voie (Nozaki et al., 2013). Une composition membranaire

différente pour les lignées Ramos et SKW6.4 pourrait expliquer les disparités de résultats que nous observons.

La régulation de l'épissage alternatif étant en partie dépendante de la phosphorylation de protéines régulatrices de l'épissage, il est envisageable que l'activation de la voie PI3K/AKT par le RTX module l'épissage de *cd20* conduisant à l'expression de D393-CD20.

La nécessité d'une présence de XL pour obtenir un effet lors du traitement des lignées est également compatible avec cette hypothèse : il est connu que la présence d'un anticorps secondaire permet une plus importante activation des voies en aval des cibles. Les voies de survie sont constitutivement activées dans les lignées cellulaires en comparaison aux cellules saines. Il se pourrait donc que la présence de l'anticorps secondaire soit nécessaire pour sur-activer ces voies, alors qu'une simple activation (même faible) permet d'obtenir un effet sur les PBMC.

DISCUSSION

L'objectif de ces travaux de thèse était de caractériser l'épissage alternatif du gène *cd20* et d'étudier le profil d'épissage de ce gène dans diverses pathologies impliquant le lymphocyte B. L'identification de plusieurs variants alternatifs surexprimés lors de la survenue d'hémopathies B suggère un potentiel rôle de ces transcrits dans l'oncogenèse et l'échappement tumoral. Par ailleurs, ces variants alternatifs pourraient également être ciblés par de nouvelles stratégies d'immunothérapie.

1. L'épissage de *cd20* est modulé lors d'hémopathies B

1.1 Cinq épissages alternatifs sont différemment exprimés lors de la survenue d'hémopathie

L'ensemble de nos résultats rapportent l'identification de 5 épissages alternatifs potentiels du gène *cd20* par utilisation de sites alternatifs d'épissage canoniques et cryptiques. Alors que l'ARNm mature CD20 est composé de 6 exons complets (exons 3 à 8), des exons ou portions d'exons sont éliminés lors des épissages alternatifs.

Le premier variant identifié au sein du laboratoire (nommé Δ CD20 (Henry et al., 2010) puis D393-CD20) est produit par utilisation de 2 sites cryptiques au sein des exons 3 et 7.

Deux des transcrits secondairement identifiés sont produits par simples sauts d'exons, l'un éliminant le seul exon 6 (D657-CD20) et l'autre éliminant les exons 4, 5 et 6 (D480-CD20). Le variant D618-CD20 est produit par utilisation d'un site donneur canonique et d'un site accepteur cryptique de l'exon 7 identique à celui de l'épissage de D393-CD20. Le plus petit variant identifié, D177-CD20 est produit par épissage entre deux sites cryptiques au sein des exons 3 et 8.

Si l'ARNm wt-CD20 est observé dans tous les lymphocytes B, sains ou néoplasiques, ce n'est pas le cas de tous les variants. Bien que tous aient été identifiés à partir de lignées cellulaires B, les ARNm D177-CD20 et D480-CD20 ne sont que très rarement observés dans l'ensemble des échantillons ou alors en quantité négligeable. Ces ARNm sont vraisemblablement très peu stables et dégradés très rapidement après leur synthèse.

Les autres transcrits alternatifs sont très faiblement exprimés en comparaison à l'ARNm wt-CD20 qui représente à lui seul 95% des isoformes totales, mais sont toutefois détectés dans les 4 lignées cellulaires B testées.

L'épissage alternatif étant largement dérégulé lors de l'oncogenèse, et D393-CD20 fréquemment observé dans les échantillons d'hémopathies malignes (Bonomi et al., 2013)(Oltean and Bates, 2013), la suite des

travaux a consisté en l'évaluation des modulations de l'épissage de *cd20* lors de la survenue de pathologies impliquant les LB.

L'étude du profil d'épissage de *cd20* dans des échantillons de PBMC prélevés chez des donneurs sains, des patients atteints d'hémopathies B et de MAI, ainsi que des PBMC transformés par l'EBV, a montré des variations d'expression des transcrits.

L'épissage alternatif au sein de PMBC issus de donneurs sain est considéré comme nul puisqu'inférieur à 0.01%. Un faible épissage alternatif a été détecté pour les échantillons de lymphomes cutanés, de lymphomes de la zone marginale, de myélomes multiples ainsi que pour les échantillons de LLC issus des protocoles BOMP et LLC-Toulouse. En revanche, une plus importante proportion de variants alternatifs a été observée dans les cohortes de lymphomes folliculaires et de haut grade, composés de lymphome de Burkitt et de DLBCL. Une augmentation, bien que plus faible, est également constatée dans les lymphomes cutanés et du manteau ainsi que pour les échantillons de LLC inclus dans la cohorte 2007SA. Ces augmentations résultent d'une plus importante expression de D657-, D618- et D393-CD20. En revanche, alors que l'épissage est également augmenté après transformation par l'EBV, seule une induction de D393-CD20 est observée : contrairement aux échantillons d'hémopathies, aucune variation d'expression de D657- et D618- n'est constatée.

Les profils d'épissage de lignées B utilisées au laboratoire sont en corrélation avec les données obtenues chez les patients : la lignée Raji issue d'un lymphome de Burkitt, et la lignée SKW6.4 transformée par l'EBV expriment une plus importante proportion de D393-CD20 tout comme les prélèvements de lymphome de haut grade et les lignées transformées par l'EBV. Rec-1 issue d'un lymphome du manteau exprime une moindre proportion de ce variant, là aussi en adéquation avec les résultats obtenus pour les patients atteints de lymphome du manteau.

En revanche, la lignée Mec-1 issue d'une LLC présente une plus forte expression de D393-CD20 que ce qui est observé chez les patients. Cette lignée a été dérivée à partir de cellules d'un patient séropositif pour l'EBV atteint de LLC. Ces cellules leucémiques se sont révélées négatives pour l'antigène EBV (EBNA) mais deux clones ont spontanément poussés en culture in vitro et se sont révélés EBNA positifs. Ces deux clones ont respectivement permis d'établir les lignées Mec-1 et Mec-2 (Stacchini et al., 1999)(Rasul et al., 2014) : l'infection de cette lignée par EBV pourrait donc expliquer l'immortalisation et la forte expression de D393-CD20.

L'ensemble de ces résultats indique une modulation de l'épissage de *cd20* lors de la survenue de pathologies affectant le lymphocyte B. Si plusieurs variants alternatifs ont été identifiés lors de ces travaux,

l'orientation de l'épissage vers la production du variant D393-CD20 semble associée au développement tumoral alors que la production de D657- et D618-CD20 pourrait être la conséquence d'une simple activation du LB.

1.2 Les causes d'une modulation de l'épissage de *cd20*

1.2.1 L'AID, une protéine clé de l'oncogenèse

L'étude du profil d'épissage nous indique une claire dérégulation de l'épissage conduisant à l'expression de D393-CD20, principalement dans les lymphomes développés à partir de LB issus des CG que sont les LF, Lymphome de Burkitt et DLBCL. Une très faible surexpression de D393-CD20 est observée dans les lymphomes cutanés et pour 2 patients sur 13 atteints de lymphome du manteau et aucun variant D393-CD20 n'a été observé chez les patients atteints de lymphome de la zone marginale. Ces résultats suggèrent une dérégulation de l'épissage au niveau des CG d'où dérivent les lymphomes de haut grade et folliculaires.

La prolifération des LB dans les CG est une étape cruciale pour l'initiation d'une réponse immunitaire efficace puisqu'elle permet les processus de maturation d'affinité du BCR.

La spécificité et l'efficacité des anticorps d'un LB activé dépendent de l'activation de l'enzyme AID nécessaire à la survenue d'hypermutations somatiques et de commutation de classe. Ces processus nécessitent la création de cassures double brin de l'ADN à l'origine de nombreuses anomalies génétiques subséquentes.

Ces processus physiologiques capitaux pour l'efficacité de la réponse immunitaire sont à l'origine de la survenue d'anomalies génétiques responsables du développement de lymphomes B (Pasqualucci et al., 2008). L'implication de l'AID a été formellement associée à la survenue de lymphomes B grâce à l'utilisation de modèles murin *aid*^{-/-} : L'absence d'AID n'a aucun impact sur le développement de tumeurs pré-CG mais réduit considérablement celui de tumeurs issues des CG ou post-CG (Pasqualucci et al., 2008). Par ailleurs, la plupart des tumeurs se développant dans ces modèles ont un phénotype identique aux lymphomes pré-CG : ces résultats démontrent in vivo que l'AID est un acteur majeur du développement de tumeurs dérivées des CG (Pasqualucci et al., 2008).

L'AID est exprimée dans les lymphomes de Burkitt et DLBCL mais plus rarement dans les LLC (Greeve et al., 2003)(Pasqualucci et al., 2004)²⁵⁷(Pasqualucci et al., 2004) et il semblerait que la survenue d'anomalie soit associée à une activité dérégulée de la protéine plutôt qu'à sa surexpression (Pasqualucci et al., 2004).

1.2.2 Dérégulation de l'épissage lors de l'activation de l'AID

L'expression d'AID dans les LB est stimulée par CD40L en présence d'IL-4 ou par une stimulation par le CMH de classe II. En revanche, les flux calciques déclenchés lors de la stimulation du BCR ont tendance à inhiber cette expression (Park, 2012).

L'AID est majoritairement cytoplasmique mais transloque fréquemment vers le noyau grâce à une séquence de localisation nucléaire. À l'intérieur du noyau cette enzyme est associée à la machinerie de la transcription mais également à celle de l'épissage : des interactions et associations ont été observées entre l'AID et les snRNP, les facteurs régulateurs U2AF65 et PTBP2 ou encore le complexe PRP19/CDC5L activateur du spliceosome (Hu et al., 2014).

Au sein de ces complexes multi-protéiques a également été identifiée la PKA. Cette holoenzyme tétramérique est constituée de deux sous-unités régulatrices agissant comme un récepteur à l'AMPc, et deux sous-unités catalytiques. Ces dernières sont responsables de la phosphorylation de l'AID au niveau des régions S de l'ADN afin d'activer sa fonction désaminase, étape indispensable à la commutation de classe des LB (Pasqualucci et al., 2006).

Le domaine catalytique de la PKA (PKA-C) est également présent dans le noyau cellulaire et particulièrement à l'intérieur des compartiments des facteurs d'épissages au sein desquels il phosphoryle plusieurs protéines du spliceosome (Kvissel et al., 2007). HA95 est une protéine de liaison à PKA-C qui pourrait également participer à la régulation de l'épissage.

L'ensemble de ces données suggère que lors de la phosphorylation de l'AID au niveau des CG, les kinases impliquées pourraient activer en parallèle des protéines régulatrices de l'épissage, participant ainsi à la modulation de l'épissage. L'importante proportion de variants alternatifs observée dans les populations de lymphome folliculaire et lymphome de haut grade pourraient ainsi résulter de ces modulations consécutivement à l'activation physiologique de l'AID.

1.3 Le variant alternatif D393-CD20 est associé à la transformation maligne

L'expression de D393-CD20 est observée dans de nombreuses pathologies malignes (lymphome folliculaire, DLBCL, lymphome de Burkitt, lymphomes EBV induits) et ne l'est pas dans les LB sains ou auto-immuns. Le fait que ce transcrit soit exprimé lors de transformation maligne induite par l'EBV mais ne le soit pas lors d'une simple réactivation du virus chez des patients immuno-déprimés ou lors d'une primo-infection déclenchant une mononucléose infectieuse conforte l'hypothèse d'une association à l'oncogenèse.

Les lymphomes folliculaires, de Burkitt et diffus à grande cellule peuvent tous trois dériver d'un LB des CG (Küppers, 2005), alors que les lymphomes de la zone marginale et des lymphomes du manteau dérivent d'un LB présent en dehors des follicules et en périphérie des centres germinatifs, respectivement. Alors que les lymphomes de la zone marginale n'expriment pas D393, les lymphomes issus des CG l'expriment tous, supportant l'hypothèse d'une corrélation de l'activation de l'AID et de la dérégulation de l'épissage. Le lymphome du manteau dérive majoritairement de cellules CD5+ localisées en périphérie des CG, mais la présence d'une population porteuse de mutations des régions V indique qu'une proportion de ces lymphomes dérive de cellules passées par les CG. Cela explique l'expression de D393-CD20 par certains patients de notre cohorte.

Lorsque le virus EBV infecte un LB naïf, il exprime un important nombre de protéines virales enclenchant une prolifération du LB. Ces protéines sont détectées par le système immunitaire dont les LT_{CD8} qui prolifèrent rapidement pour éliminer le virus. Chez les patients immunodéprimés incapables d'éliminer le virus, cette infection peut évoluer en lymphomes post-transplantation (PTLD). Ce profil est similaire aux lignées transformées in vitro par l'EBV (DBCL) dont l'établissement nécessite une élimination des LT. Les LB activés par l'EBV mais non éliminés par les LT_{CD8} expriment un autre ensemble de protéines virales dont EBNA1, LMP-1 et LMP-2. Ils se différencient dans les CG et de ces cellules infectées peuvent dériver les lymphomes de Hodgkin. Le virus persiste ensuite dans des LB circulants, « resting » ou mémoires et seul l'antigène EBNA-1 est exprimé : le virus est latent. C'est à cette phase du cycle viral que les lymphomes de Burkitt peuvent se développer en cas d'anomalies additionnelles.

La question qui se pose est de déterminer si la dérégulation de l'épissage observée lors de la transformation liée à l'EBV résulte d'une action directe du virus sur l'épissage cellulaire, ou est une conséquence de l'oncogenèse.

La modulation de l'épissage par les protéines virales est un phénomène connu : le papilloma virus humain (HPV) induit un épissage alternatif du récepteur au facteur de croissance des fibroblastes (FGFR) qui induit la transition épithélio-mésenchymateuse, (Ranieri et al., 2015) et le virus associé au syndrome de Kaposi modifie l'activité de SRSF3 (Majerciak et al., 2014). Ce dernier étant impliqué dans l'épissage du gène codant le suppresseur de tumeur PDCD4, une modulation de l'activité de SRSF3 participe à l'oncogenèse (Kim et al., 2014). Des cas de trans-épissage ont également été mis en évidence récemment, induisant la formation d'ARN chimériques par jonction d'exons viraux et cellulaires par le spliceosome (Poddar et al., 2014). Pour ce qui est de l'EBV, la protéine virale BMLF1 a été identifiée comme modulatrice d'épissage alternatif et est associée aux facteurs d'épissage SRSF1, SRSF3 et SRSF7 entre autres (Verma et al., 2010).

Elle se fixe sur le pré-ARNm et y recrute des protéines SRSF3 cellulaires qui régulent alors l'épissage de gènes impliqués dans la tumorigenèse tels que *cd44* et *tp53*. Le recrutement de SRSF3 par BMLF1 permet sa fixation sur un ESE, favorisant la sélection d'un site cryptique lors de l'épissage de *stat-1* par exemple (Verma et al., 2010). Cette association est nécessaire au recrutement du spliceosome puisque BMLF1 ne possède pas de domaine RS contrairement à SRSF3.

Cependant, l'absence de D393-CD20 chez les patients atteints de MNI ou en simple réactivation virale suggère une absence d'implication des protéines virales de latence puisqu'elles sont toutes exprimées durant la primo-infection sans induire d'expression de D393-CD20.

Il semble donc que la dérégulation spécifique de l'épissage conduisant à l'expression de D393-CD20 soit plutôt associée à la transformation plutôt qu'à la seule infection virale, et plusieurs protéines virales sont impliquées dans l'oncogenèse.

Parmi celles-ci, EBNA-2 participe à l'induction de transcription de LMP-1 et LMP-2 par l'intermédiaire d'un complexe comprenant entre autre hnRNP-D, régulatrice de l'épissage.

L'AID est également activée par un autre oncogène viral, LMP-1. Ce dernier, en plus de participer à la transformation maligne en activant l'expression des anti-apoptotiques BCL-2, A20 et MCL-1, active lui aussi l'expression de l'AID (Kim et al., 2013), dont l'association avec des protéines régulatrices de l'épissage a été évoquée plus haut (Hu et al., 2014).

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'épissage de *cd20* chez des patients atteints de pathologies auto-immunes (pemphigus vulgaire (Gamonet et al., 2014), polyarthrite rhumatoïde (Gamonet et al., 2015) mais aussi PTI) confirment également cette hypothèse : le variant D393-CD20 n'a jamais été détecté dans ces échantillons, que ce soit lors de l'étude au sein de PBMC après traitement par RTX ou au diagnostic, de prélèvements de membranes synoviales ou de cellules B activées *in vitro*. Les variants D657- et D618- ont été détectés dans plusieurs échantillons, argumentant là encore en faveur d'une expression de D393-CD20 associée à la transformation maligne et non à une simple activation des LB.

2. Conséquences possibles de la dérégulation de l'épissage

La modulation de l'épissage de *cd20* lors de l'oncogenèse engendre plusieurs conséquences distinctes. Devant la nécessité de disposer de nouveaux biomarqueurs pour mieux stratifier les pathologies malignes et particulièrement les LLC, la possibilité d'utiliser l'épissage de *cd20* comme marqueur biologique ou facteur prédictif doit être évaluée. Ensuite se pose la question de l'implication de cet épissage alternatif dans l'échappement au système immunitaire : il avait été montré une association de l'expression de D393-

CD20 et de la résistance au RTX (Henry et al., 2010). La modulation de l'épissage de *cd20* peut-il être un mécanisme d'échappement des cellules tumorales ? Enfin, comme tout épissage alternatif, celui de *cd20* conduit à la production d'Ag pouvant potentiellement devenir des cibles de stratégies d'immunothérapie.

2.1 L'épissage de *cd20* comme facteur prédictif des LLC

Une plus fine stratification des LLC est nécessaire pour mieux prédire l'évolution de cette pathologie et adapter la stratégie thérapeutique.

Afin de déterminer si l'épissage alternatif de *cd20* peut devenir dans le futur un marqueur prédictif de l'évolution des LLC, nous avons étudié les données clinico-biologiques des patients inclus dans les cohortes BOMP et LLC-Toulouse. Nous observons une corrélation positive entre la proportion de variants alternatifs et le statut mutationnel de *sf3b1*, ainsi qu'avec la réponse au traitement des patients : le groupe de patients exprimant la plus importante quantité de variants alternatifs est celui présentant le meilleur taux de réponses complètes. Ces résultats ne sont pas en adéquation avec la littérature, qui associe les mutations de *sf3b1* à un mauvais pronostic (Oscier et al., 2013). Une corrélation négative est mise en évidence avec le statut mutationnel de *notch1* et aucun lien direct ne peut être établi ni avec la classification de BINET, ni avec les marqueurs classiquement recherchés lors du diagnostic (IgHV, ZAP70, CD38) ni avec la survie globale. En revanche, 82% des faibles exprimeurs de variants alternatifs sont des patients considérés par les cliniciens comme étant « à très haut risque » pour seulement 56% des forts exprimeurs, associant là encore l'absence d'épissage à un moins bon pronostic.

Aucune franche corrélation n'est en revanche mise en évidence avec les données des patients inclus dans la cohorte LLC-Toulouse. Cette différence peut être expliquée par la composition des cohortes : alors que la cohorte BOMP est composée de seulement 11% de stades A pour 52% de stades B et 35% de stades C, la cohorte LLC-Toulouse est composée pour la moitié de stades A, 30% de stades B et 20% de stades C. L'hétérogénéité des stades rend délicate la comparaison des cohortes entre elles et expliquent les divergences de résultats obtenus. De plus, le statut mutationnel de *sf3b1* est facteur prédictif au diagnostic, mais les patients inclus dans le protocole BOMP ont déjà été traités par RTX, limitant donc la significativité de ce marqueur.

Les mutations de *sf3b1*, qui modifient l'action de la protéine régulatrice de l'épissage codée par ce gène (DeBoever et al., 2015), pourraient être à l'origine des modulations d'épissage de *cd20* au même titre que d'autres gènes, influençant ainsi la survie ou la réponse au traitement.

Malgré les tendances mises en évidence par nos résultats, ces travaux ne permettent pas à l'heure actuelle d'affirmer que les modulations d'épissage de *cd20* puissent être utilisées à des fins diagnostiques ou d'orientation thérapeutique.

2.2 Implication dans l'échappement tumoral

Bien que la fonction de la protéine CD20 ne soit à l'heure actuelle pas formellement identifiée, plusieurs études ont apporté de solides arguments en faveur d'une implication de cette protéine dans la survie des LB. Les voies de signalisation calcique en aval du BCR sont impliquées puisque l'utilisation d'anticorps anti-CD20 et anti-IgM activent les mêmes voies de signalisation intra cellulaires, par l'engagement de la kinase Syk entre autre (Franke et al., 2011).

Les expériences d'inactivation de CD20 ainsi que les modèles murins *cd20*^{-/-} excluent cependant une fonction majeure de cette protéine, puisque le développement de LB n'est pas altéré par l'absence de la protéine.

A l'heure actuelle, une des plus importantes caractéristiques de CD20 demeure sa large expression à la surface des populations lymphocytaires B (4 fois plus importante que celle de CD19 sur un LB mature) (Ginaldi et al., 1998). Cela lui permet d'être une cible efficace pour la déplétion de LB en traitement de pathologies malignes ou auto-immunes. L'utilisation de plusieurs anticorps anti-CD20 tels que le RTX, l'OFA ou plus récemment le GA101 en traitement de première ligne de pathologies B témoigne de cette efficacité.

La production de variants alternatifs peut avoir plusieurs impacts distincts pour la cellule : elle peut se faire au détriment des transcrits sauvages et ainsi limiter l'expression de la protéine, mais il est également fréquemment observé une fonction antagoniste pour ces variants, altérant la fonction de la protéine sauvage (Oltean and Bates, 2013).

Afin de comprendre les impacts de l'épissage sur la fonction de WT-CD20, nous avons souhaité identifier les protéines potentiellement codées par les variants alternatifs. Des WB révélés à l'aide d'un anticorps anti-CD20 spécifique de la région C-ter ont permis de détecter D393-CD20. Les autres variants n'ont en revanche jamais été détectés lors de l'expression des séquences codantes dans des lignées: si D177-CD20 semble avoir une portion C-ter conservée par rapport à WT-CD20 trop petite pour être ciblée, les autres variants peuvent théoriquement être reconnus par l'anticorps. Le fait qu'ils ne le soient pas peut signifier une altération dans la structure de l'épitope de l'anticorps utilisé, ou plus simplement une absence de traduction de ces variants. Cependant, plusieurs bandes additionnelles ont été observées lors de WB de prélèvements de patients atteints de lymphomes ou leucémies, à des tailles correspondant à la taille

théoriques des protéines potentiellement codées par les variants alternatifs. Par exemple, le variant D657-CD20, d'une taille de 657pb coderait une protéine d'environ 24kDa, ce qui correspond à la bande additionnelle observée au-dessus de D393-CD20 dans la figure xx A.

Dans de précédents travaux, l'expression de D393-CD20 avait été associée à la résistance au traitement par RTX. Ces résultats n'ont pas pu être confirmés lors de ces travaux de thèse ni par l'utilisation de modèles de cellules résistantes, ni par la mise en place de lignées exprimant D393-CD20 afin de tester leur sensibilité.

Si un rôle direct de D393-CD20 provoquant une résistance au RTX n'est pas démontré, la dérégulation de l'épissage engendrée par le RTX pourrait cependant être assimilée à un mécanisme d'échappement au traitement: l'induction d'expression de D393-CD20 étant associée à une perte d'expression de WT-CD20 lors du traitement de PBMC issus de donneurs sains, la modulation de l'épissage au détriment de WT-CD20 permettrait la diminution d'expression des cibles du RTX, le rendant ainsi moins efficace.

2.3 Développement d'immunothérapie ciblant les variants

L'identification d'un variant alternatif D393-CD20 associée à la transformation maligne mais absent des LB sains ou auto-immuns a conduit notre équipe à évaluer son potentiel immunogène afin d'envisager une stratégie de vaccination anti-tumorale ciblant ce variant.

La pression de sélection exercée par le système immunitaire lors de l'élimination de cellules tumorales ou transformées conduit à l'édition tumorale c'est-à-dire à la sélection de nouveaux variants tumoraux non reconnus par le système immunitaire. Cette théorie de l'immuno-éditing a été établie en 2004 par Robert Schreiber qui a identifié 3 phases distinctes du développement tumoral sous contrôle du système immunitaire: l'élimination, l'équilibre et l'échappement. C'est uniquement lors de la phase d'échappement au système immunitaire que la tumeur devient cliniquement détectable et symptomatique (Dunn et al., 2004).

Le développement d'un cancer témoigne d'une incapacité du système immunitaire à contrôler et éliminer les cellules tumorales. Plusieurs événements cellulaires contribuent à cet échappement afin de réduire la sensibilité des cellules à la mort cellulaire, restreindre l'expression des molécules reconnues par les acteurs du système immunitaire ou encore affaiblir les cellules effectrices de l'immunité (Upadhyay et al., 2015). Les anomalies génétiques contribuent également largement à l'échappement tumoral : les mutations survenant au niveau des séquences codantes de l'ADN peuvent se traduire par la synthèse de polypeptides non reconnus par les cellules immunitaires et particulièrement les LT. Les cellules porteuses de ce type de

mutations échappent donc au système immunitaire, poursuivent leur prolifération participant ainsi au changement phénotypique de la tumeur par pression de sélection.

De la même manière, l'épissage alternatif de nombreux gènes permet l'échappement au système immunitaire d'une part par un renforcement des capacités de prolifération, migration ou invasion mais probablement également par élimination d'épitopes ciblés par le système immunitaire. Quelques données de la littérature confirment cette hypothèse : une large étude des épissages associés au cancer menée par l'équipe de Stranzl montre une diminution des épitopes restreints par les HLA-I les plus connus dans les tissus tumoraux (Stranzl et al., 2012).

Cette hypothèse demeure peu documentée dans la littérature, mais il apparaît probable que les épissages alternatifs conduisant à la synthèse de protéines tronquées éliminent des épitopes reconnus par les cellules immunitaires participant ainsi à l'échappement tumoral.

A l'inverse, ces anomalies génétiques contribuent à la génération de nouveaux épitopes tumoraux pouvant être, entre autre, la cible d'immunothérapie (Nakatsugawa et al., 2009)(Idenoue et al., 2005). C'est par exemple le cas d'une mutation du gène *ras* observée à une importante fréquence dans les cancers : la mutation du codon 12 (Gly>Val) constitue un néo-Ag présenté par le HLA-A2 contrairement à la séquence sauvage. Les LT_{CD8} spécifiques ainsi activés permettent l'élimination de lignées cellulaires porteuses de la mutation (Bergmann-Leitner et al., 1998).

Des néo-épitopes peuvent également dériver d'épissages alternatifs spécifiques des cancers. Un variant alternatif de la protéine SURVIVIN induit une réponse cytotoxique après reconnaissance par les LT d'un peptide dérivé d'un variant alternatif présenté par le HLA-A24 (Idenoue et al., 2005). De la même manière, un variant alternatif de la protéine LENGGIN (LENGGIN_vt4) est exprimé dans les cancers du poumon alors que la protéine sauvage l'est uniquement au niveau de l'œil, site de privilège humain. Des auto-anticorps anti LENGGIN_vt4 circulants sont détectés uniquement chez les patients atteints de cancer du poumon et cet antigène pourrait selon les auteurs être une excellente cible d'immunothérapie (Nakatsugawa et al., 2009).

Il est à noter que beaucoup de nouveaux épitopes générés par épissage alternatif le sont par décalage du cadre de lecture, ce qui n'est pas le cas des variants CD20 : les seuls néo-épitopes pouvant être générés le seraient au niveau des zones de jonction créées par l'épissage alternatif et donc absentes du polypeptide sauvage.

Des LT_{CD4} de type Th1 spécifiques dirigés contre D393-CD20 ont pu être isolés de prélèvements sanguins de patients atteints d'hémopathies B soulignant la possibilité d'élaborer une stratégie vaccinale anti-

tumorale afin de stimuler les réponses T dirigées contre cet Ag de tumeur (Vauchy et al., 2015). Les autres transcrits identifiés ne semblent pas être des candidats intéressants pour cette stratégie en raison de leur extrêmement faible niveau d'expression en ce qui concerne D177- et D480-CD20 et en raison de leur expression basale par les PBMC sains pour D618- et D657-CD20.

L'épissage de *cd20* pourrait correspondre à un mécanisme d'édition des cellules tumorales. En effet, l'élimination d'une large portion extra membranaire lors de cet épissage élimine l'épitope du RTX et il semble également probable que d'autres épitopes soient éliminés, empêchant sa reconnaissance par les cellules immunitaires. L'immunothérapie spécifique de D393-CD20 en addition au RTX pourrait permettre l'élimination des cellules tumorales ayant échappé au traitement par RTX en première intention et ainsi améliorer la prise en charge des hémopathies B malignes.

Conclusions et perspectives

L'ensemble de ces travaux de thèse suggèrent une dérégulation de l'épissage alternatif du gène *cd20* lors du développement de pathologies malignes touchant le LB. Deux dérégulations distinctes semblent survenir. Une dérégulation générale de l'épissage survient lors du développement de MAI, d'infections virales et de cancers, et semble associée à une prolifération accrue des LB.

Afin de déterminer le potentiel biomarqueur de l'épissage de *cd20*, il sera nécessaire de comparer le profil d'épissage de patients avec leurs données clinico-biologiques au diagnostic et à long terme, afin de suivre l'évolution de la maladie, la réponse au traitement et la survie des patients en fonction de la proportion d'épissage au moment du diagnostic.

La corrélation entre le statut mutationnel de *sf3b1* et la quantité d'épissage suggère une association entre ce facteur régulateur et l'épissage de *cd20*, ce qui pourrait être investigué par l'inhibition de l'expression de SF3B1.

Une dérégulation plus spécifique est constatée lors de l'oncogenèse, particulièrement lors d'une transformation maligne au niveau des CG ou consécutive à une infection par EBV.

L'implication des voies activatrices de l'AID dans la modulation de l'épissage pourra être investiguée in vitro : l'activation de lymphocytes B par CD40L et IL-4 suffit-elle à moduler l'épissage de *cd20* ?

Une investigation plus approfondie des conditions de surexpression de D393-CD20, plus particulièrement par l'intermédiaire de la voie PI3K/AKT, sera nécessaire pour déterminer si ces modulations peuvent altérer ou non l'efficacité des traitements ciblant CD20.

Il sera également intéressant d'évaluer l'impact des autres anti-CD20 sur l'épissage de cd20 : si l'OFA a sensiblement les mêmes mécanismes d'action que le RTX, le GA101 étant un AcMo de type II ne relocalise pas CD20 au sein des radeaux, et pourrait de ce fait ne pas activer les mêmes voies de signalisation que le RTX.

La compréhension globale de l'épissage du gène CD20, tant au niveau de sa régulation lors de l'oncogenèse, de la fonction des variants alternatifs en résultant, que de la modulation d'expression de la protéine sauvage, permettra une meilleure prise en charge thérapeutique de nombreux patients souffrant d'hémopathies B.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdelwahed, R.B., Donnou, S., Ouakrim, H., Crozet, L., Cosette, J., Jacquet, A., Tourais, I., Fournès, B., Bocquet, M.G., Miloudi, A., et al. (2013). Preclinical Study of Ublituximab, a Glycoengineered Anti-Human CD20 Antibody, in Murine Models of Primary Cerebral and Intraocular B-Cell Lymphomas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *54*, 3657–3665.
- Albanesi, M., Mancardi, D.A., Jönsson, F., Iannascoli, B., Fiette, L., Santo, J.P.D., Lowell, C.A., and Bruhns, P. (2013). Neutrophils mediate antibody-induced antitumor effects in mice. *Blood* *122*, 3160–3164.
- Allen, C.D.C., Okada, T., Tang, H.L., and Cyster, J.G. (2007). Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* *315*, 528–531.
- Almasri, N.M., Duque, R.E., Iturraspe, J., Everett, E., and Braylan, R.C. (1992). Reduced expression of CD20 antigen as a characteristic marker for chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* *40*, 259–263.
- Araki, S., Dairiki, R., Nakayama, Y., Murai, A., Miyashita, R., Iwatani, M., Nomura, T., and Nakanishi, O. (2015). Inhibitors of CLK Protein Kinases Suppress Cell Growth and Induce Apoptosis by Modulating Pre-mRNA Splicing. *PLoS ONE* *10*.
- Arpin, C., de Bouteiller, O., Razanajaona, D., Fugier-Vivier, I., Briere, F., Banchereau, J., Lebecque, S., and Liu, Y.-J. (1998). The Normal Counterpart of IgD Myeloma Cells in Germinal Center Displays Extensively Mutated IgVH Gene, C γ -C γ Switch, and κ Light Chain Expression. *J. Exp. Med.* *187*, 1169–1178.
- Askary, A., Shimazaki, N., Bayat, N., and Lieber, M.R. (2014). Modeling of the RAG Reaction Mechanism. *Cell Rep.* *7*, 307–315.
- Aznarez, I., Zielenski, J., Rommens, J.M., Blencowe, B.J., and Tsui, L. (2007). Exon skipping through the creation of a putative exonic splicing silencer as a consequence of the cystic fibrosis mutation R553X. *J. Med. Genet.* *44*, 341–346.
- Baliakas, P., Hadzidimitriou, A., Sutton, L.-A., Rossi, D., Minga, E., Villamor, N., Larrayoz, M., Kminkova, J., Agathangelidis, A., Davis, Z., et al. (2015). Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic. *Leukemia* *29*, 329–336.
- Bannard, O., Horton, R.M., Allen, C.D.C., An, J., Nagasawa, T., and Cyster, J.G. (2013). Germinal Center Centroblasts Transition to a Centrocyte Phenotype According to a Timed Program and Depend on the Dark Zone for Effective Selection. *Immunity* *39*, 912–924.
- Basile, G. de S., Ménasché, G., and Fischer, A. (2010). Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 568–579.
- Bauman, J.A., Li, S.-D., Yang, A., Huang, L., and Kole, R. (2010). Anti-tumor activity of splice-switching oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* *38*, 8348–8356.
- Benoit, M.E., Clarke, E.V., Morgado, P., Fraser, D.A., and Tenner, A.J. (2012). Complement Protein C1q Directs Macrophage Polarization and Limits Inflammasome Activity during the Uptake of Apoptotic Cells. *J. Immunol.* *188*, 5682–5693.
- Bentley, D.L. (2014). Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 163–175.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). Diversity Is Generated by Gene Rearrangements.
- Berget, S.M. (1995). Exon Recognition in Vertebrate Splicing. *J. Biol. Chem.* *270*, 2411–2414.
- Bergmann-Leitner, E.S., Kantor, J.A., Shupert, W.L., Schlom, J., and Abrams, S.I. (1998). Identification of a human CD8+ T lymphocyte neo-epitope created by a ras codon 12 mutation which is restricted by the HLA-A2 allele. *Cell. Immunol.* *187*, 103–116.
- Berkowska, M.A., Driessen, G.J.A., Bikos, V., Grosserichter-Wagener, C., Stamatopoulos, K., Cerutti, A., He, B., Biermann, K., Lange, J.F., Burg, M. van der, et al. (2011). Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* *118*, 2150–2158.
- Beum, P.V., Mack, D.A., Pawluczkwycz, A.W., Lindorfer, M.A., and Taylor, R.P. (2008). Binding of Rituximab, Trastuzumab, Cetuximab, or mAb T101 to Cancer Cells Promotes Trogocytosis Mediated by THP-1 Cells and Monocytes. *J. Immunol.* *181*, 8120–8132.
- Bialecki, E., Paget, C., Fontaine, J., Capron, M., Trottein, F., and Faveeuw, C. (2009). Role of Marginal Zone B Lymphocytes in Invariant NKT Cell Activation. *J. Immunol.* *182*, 6105–6113.
- Bielli, P., Bordi, M., Biasio, V.D., and Sette, C. (2014). Regulation of BCL-X splicing reveals a role for the polypyrimidine tract binding protein (PTBP1/hnRNP I) in alternative 5' splice site selection. *Nucleic Acids Res.* *42*, 12070–12081.
- Bonavida, B. (2006). What signals are generated by anti-CD20 antibody therapy? *Curr. Hematol. Malig. Rep.* *1*, 205–213.
- Bonomi, S., Gallo, S., Catillo, M., Pignataro, D., Biamonti, G., and Ghigna, C. (2013). Oncogenic Alternative Splicing Switches: Role in Cancer Progression and Prospects for Therapy. *Int. J. Cell Biol.* *2013*.
- Borge, M., Almejún, M.B., Podaza, E., Colado, A., Grecco, H.F., Cabrejo, M., Bezares, R.F., Giordano, M., and Gamberale, R. (2015). Ibrutinib impairs the phagocytosis of rituximab-coated leukemic cells from chronic lymphocytic leukemia patients by human macrophages. *Haematologica* *100*, e140–e142.
- Boyiadzis, M., and Whiteside, T.L. Information transfer by exosomes: A new frontier in hematologic malignancies. *Blood Rev.*
- Brogn, S., and Wen, J. (2009). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 107–113.
- Bubien, J.K., Zhou, L.J., Bell, P.D., Frizzell, R.A., and Tedder, T.F. (1993). Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J. Cell Biol.* *121*, 1121–1132.
- Buratti, E., Muro, A.F., Giombi, M., Gherbassi, D., Iaconcig, A., and Baralle, F.E. (2004). RNA Folding Affects the Recruitment of SR Proteins by Mouse and Human Polypurinic Enhancer Elements in the Fibronectin EDA Exon. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 1387–1400.
- Burger, J.A. (2011). Inhibiting B-Cell Receptor Signaling Pathways in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* *7*, 26–33.

Burger, J.A., Keating, M.J., Wierda, W.G., Hartmann, E., Hoellenriegel, J., Rosin, N.Y., de Weerd, I., Jeyakumar, G., Ferrajoli, A., Cardenas-Turan, M., et al. (2014). Ibrutinib plus rituximab for patients with high-risk chronic lymphocytic leukaemia: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 15, 1090–1099.

Burrows, P.D., Stephan, R.P., Wang, Y.-H., Lassoued, K., Zhang, Z., and Cooper, M.D. (2002). The transient expression of pre-B cell receptors governs B cell development. *Semin. Immunol.* 14, 343–349.

Byrd, J.C., Kitada, S., Flinn, I.W., Aron, J.L., Pearson, M., Lucas, D., and Reed, J.C. (2002). The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood* 99, 1038–1043.

Camacho, E., Hernández, L., Hernández, S., Tort, F., Bellosillo, B., Beà, S., Bosch, F., Montserrat, E., Cardesa, A., Fernández, P.L., et al. (2002). ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 99, 238–244.

Cang, S., Mukhi, N., Wang, K., and Liu, D. (2012). Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *J. Hematol. Oncol.* 5, 64.

Cariappa, A., Tang, M., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K., and Pillai, S. (2001). The Follicular versus Marginal Zone B Lymphocyte Cell Fate Decision Is Regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* 14, 603–615.

Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99, 754–758.

Castigli, E., Wilson, S.A., Scott, S., Dedeoglu, F., Xu, S., Lam, K.-P., Bram, R.J., Jabara, H., and Geha, R.S. (2005). TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J. Exp. Med.* 201, 35–39.

Castillo, J., and Perez, K. (2010). The role of ofatumumab in the treatment of chronic lymphocytic leukemia resistant to previous therapies. *J. Blood Med.* 1, 1–8.

Casulo, C., Vose, J.M., Ho, W.Y., Kahl, B., Brunvand, M., Goy, A., Kasamon, Y., Cheson, B., and Friedberg, J.W. (2014). A phase I study of PRO131921, a novel anti-CD20 monoclonal antibody in patients with relapsed/refractory CD20+ indolent NHL: correlation between clinical responses and AUC pharmacokinetics. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 154, 37–46.

Chan, O.T.M., Hannum, L.G., Haberman, A.M., Madaio, M.P., and Shlomchik, M.J. (1999). A Novel Mouse with B Cells but Lacking Serum Antibody Reveals an Antibody-independent Role for B Cells in Murine Lupus. *J. Exp. Med.* 189, 1639–1648.

Chang, F., Steelman, L.S., Lee, J.T., Shelton, J.G., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R.A., and McCubrey, J.A. (2003). Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 17, 1263–1293.

Chang, J.-G., Yang, D.-M., Chang, W.-H., Chow, L.-P., Chan, W.-L., Lin, H.-H., Huang, H.-D., Chang, Y.-S., Hung, C.-H., and Yang, W.-K. (2011). Small Molecule Amiloride Modulates Oncogenic RNA Alternative Splicing to Devitalize Human Cancer Cells. *PLoS ONE* 6.

Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R.T., Datta, A., et al. (2007). Evolution of the Immunoglobulin Heavy Chain Class Switch Recombination Mechanism. In *Advances in Immunology*, Frederick W. Alt and Tasuku Honjo, ed. (Academic Press), pp. 157–214.

Chen, L.L., Sabripour, M., Wu, E.F., Prieto, V.G., Fuller, G.N., and Frazier, M.L. (2005). A mutation-created novel intra-exonic pre-mRNA splice site causes constitutive activation of KIT in human gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 24, 4271–4280.

Chevrier, S., Genton, C., Malissen, B., Malissen, M., and Acha-Orbea, H. (2012). Dominant Role of CD80-CD86 Over CD40 and ICOSL in the Massive Polyclonal B Cell Activation Mediated by LATY136F CD4+ T Cells. *Front. Immunol.* 3.

Choudhary, C., Kumar, C., Gnäd, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science* 325, 834–840.

Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., and Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193, 3–34.

Codogno, P. (2004). Les gènes ATG et la macro-autophagie. *MS Médecine Sci.* 20, 734–736.

Coiffier, B., Haioun, C., Ketterer, N., Engert, A., Tilly, H., Ma, D., Johnson, P., Lister, A., Feuring-Buske, M., Radford, J.A., et al. (1998). Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood* 92, 1927–1932.

Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Van Den Neste, E., Salles, G., Gaulard, P., et al. (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 346, 235–242.

combes, bernard (2008). De l'immunopathologie aux traitements de la polyarthrite rhumatoïde. *Immunorhumatol. Pour Prat.*

Corcos, L., and Solier, S. (2005). [Alternative mRNA splicing, pathology and molecular therapeutics]. *Médecine Sci. MS* 21, 253–260.

de la Cruz, J., Kressler, D., and Linder, P. (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* 24, 192–198.

Czuczman, M.S., Grillo-López, A.J., White, C.A., Saleh, M., Gordon, L., LoBuglio, A.F., Jonas, C., Klippenstein, D., Dallaire, B., and Varns, C. (1999). Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 17, 268–276.

Dalle, S., Reslan, L., Horts, T.B. de, Herveau, S., Herting, F., Plesa, A., Friess, T., Umana, P., Klein, C., and Dumontet, C. (2011). Preclinical Studies on the Mechanism of Action and the Anti-Lymphoma Activity of the Novel Anti-CD20 Antibody GA101. *Mol. Cancer Ther.* *10*, 178–185.

Das, S., and Krainer, A.R. (2014). Emerging Functions of SRSF1, Splicing Factor and Oncoprotein, in RNA Metabolism and Cancer. *Mol. Cancer Res.* *12*, 1195–1204.

Das, S., Anczuków, O., Akerman, M., and Krainer, A.R. (2012). ONCOGENIC SPLICING FACTOR SRSF1 IS A CRITICAL TRANSCRIPTIONAL TARGET OF MYC. *Cell Rep.* *1*, 110–117.

DeBoever, C., Ghia, E.M., Shepard, P.J., Rassenti, L., Barrett, C.L., Jepsen, K., Jamieson, C.H.M., Carson, D., Kipps, T.J., and Frazer, K.A. (2015). Transcriptome Sequencing Reveals Potential Mechanism of Cryptic 3' Splice Site Selection in SF3B1-mutated Cancers. *PLoS Comput. Biol.* *11*.

DiFeo, A., Narla, G., Hirshfeld, J., Camacho-Vanegas, O., Narla, J., Rose, S.L., Kalir, T., Yao, S., Levine, A., Birrer, M.J., et al. (2006). Roles of KLF6 and KLF6-SV1 in Ovarian Cancer Progression and Intraperitoneal Dissemination. *Clin. Cancer Res.* *12*, 3730–3739.

Di Modugno, F., Iapicca, P., Boudreau, A., Mottolese, M., Terrenato, I., Perracchio, L., Carstens, R.P., Santoni, A., Bissell, M.J., and Nisticò, P. (2012). Splicing program of human MENA produces a previously undescribed isoform associated with invasive, mesenchymal-like breast tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 19280–19285.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* *21*, 137–148.

Dzietczenia, J., Wróbel, T., Mazur, G., Poreba, R., Jaźwiec, B., and Kuliczowski, K. (2010). Expression of complement regulatory proteins: CD46, CD55, and CD59 and response to rituximab in patients with CD20+ non-Hodgkin's lymphoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* *27*, 743–746.

Ellebrecht, C.T., Choi, E.J., Allman, D.M., Tsai, D.E., Wegener, W.A., Goldenberg, D.M., and Payne, A.S. (2014). Subcutaneous Veltuzumab, a Humanized Anti-CD20 Antibody, in the Treatment of Refractory Pemphigus Vulgaris. *JAMA Dermatol.* *150*, 1331–1335.

Emery, P., Rigby, W., Tak, P.P., Dörner, T., Olech, E., Martin, C., Millar, L., Travers, H., and Fisheleva, E. (2014). Safety with Ocrelizumab in Rheumatoid Arthritis: Results from the Ocrelizumab Phase III Program. *PLoS ONE* *9*.

Eming, R., Hennerici, T., Bäcklund, J., Feliciani, C., Visconti, K.C., Willenborg, S., Wohde, J., Holmdahl, R., Sørenstrup, G., and Hertl, M. (2014). Pathogenic IgG Antibodies against Desmoglein 3 in Pemphigus Vulgaris Are Regulated by HLA-DRB1*04:02-Restricted T Cells. *J. Immunol.* 1401081.

Enders, A., Short, A., Miosge, L.A., Bergmann, H., Sontani, Y., Bertram, E.M., Whittle, B., Balakishnan, B., Yoshida, K., Sjollem, G., et al. (2014). Zinc-finger protein ZFP318 is essential for expression of IgD, the alternatively spliced Igh product made by mature B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 4513–4518.

- Erkelenz, S., Mueller, W.F., Evans, M.S., Busch, A., Schöneweis, K., Hertel, K.J., and Schaal, H. (2013). Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms. *RNA* 19, 96–102.
- Faustino, N.A., and Cooper, T.A. (2003). Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 17, 419–437.
- Feng, Y., Chen, M., and Manley, J.L. (2008). Phosphorylation switches the general splicing repressor SRp38 to a sequence-specific activator. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 1040–1048.
- Franke, A., Niederfellner, G.J., Klein, C., and Burtscher, H. (2011). Antibodies against CD20 or B-Cell Receptor Induce Similar Transcription Patterns in Human Lymphoma Cell Lines. *PLoS ONE* 6.
- Freeman, S.A., and Grinstein, S. (2014). Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol. Rev.* 262, 193–215.
- Friend, L.R., Landsberg, M.J., Nouwens, A.S., Wei, Y., Rothnagel, J.A., and Smith, R. (2013). Arginine Methylation of hnRNP A2 Does Not Directly Govern Its Subcellular Localization. *PLoS ONE* 8.
- Furman, R.R., Sharman, J.P., Coutre, S.E., Cheson, B.D., Pagel, J.M., Hillmen, P., Barrientos, J.C., Zelenetz, A.D., Kipps, T.J., Flinn, I., et al. (2014). Idelalisib and Rituximab in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 370, 997–1007.
- Gagez, A.-L., and Cartron, G. (2014). Obinutuzumab: a new class of anti-CD20 monoclonal antibody. *Curr. Opin. Oncol.* 26, 484–491.
- Gammons, M.V., Lucas, R., Dean, R., Coupland, S.E., Oltean, S., and Bates, D.O. (2014). Targeting SRPK1 to control VEGF-mediated tumour angiogenesis in metastatic melanoma. *Br. J. Cancer* 111, 477–485.
- Gamonet, C., Ferrand, C., Colliou, N., Musette, P., Joly, P., Girardin, M., Humbert, P., and Aubin, F. (2014). Lack of expression of an alternative CD20 transcript variant in circulating B cells from patients with pemphigus. *Exp. Dermatol.* 23, 66–67.
- Gamonet, C., Deschamps, M., Marion, S., Herbein, G., Chiocchia, G., Auger, I., Saas, P., Ferrand, C., and Toussiot, E. (2015). The alternative CD20 transcript variant is not a surrogate marker for resistance to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 54, 1744–1745.
- Gao, Y., and Koide, K. (2013). Chemical perturbation of Mcl-1 pre-mRNA splicing to induce apoptosis in cancer cells. *ACS Chem. Biol.* 8, 895–900.
- Ghigna, C., Giordano, S., Shen, H., Benvenuto, F., Castiglioni, F., Comoglio, P.M., Green, M.R., Riva, S., and Biamonti, G. (2005). Cell Motility Is Controlled by SF2/ASF through Alternative Splicing of the Ron Protooncogene. *Mol. Cell* 20, 881–890.
- Ghigna, C., Valacca, C., and Biamonti, G. (2008). Alternative Splicing and Tumor Progression. *Curr. Genomics* 9, 556–570.
- Ghosh, A., Stewart, D., and Matlashewski, G. (2004). Regulation of Human p53 Activity and Cell Localization by Alternative Splicing. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7987–7997.

- Ginaldi, L., Martinis, M.D., Matutes, E., Farahat, N., Morilla, R., and Catovsky, D. (1998). Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J. Clin. Pathol.* *51*, 364–369.
- Golan-Gerstl, R., Cohen, M., Shilo, A., Suh, S.-S., Bakács, A., Coppola, L., and Karni, R. (2011). Splicing Factor hnRNP A2/B1 Regulates Tumor Suppressor Gene Splicing and Is an Oncogenic Driver in Glioblastoma. *Cancer Res.* *71*, 4464–4472.
- Golay, J., Zaffaroni, L., Vaccari, T., Lazzari, M., Borleri, G.-M., Bernasconi, S., Tedesco, F., Rambaldi, A., and Introna, M. (2000). Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* *95*, 3900–3908.
- Golay, J., Manganini, M., Facchinetti, V., Gramigna, R., Broady, R., Borleri, G., Rambaldi, A., and Introna, M. (2003). Rituximab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against neoplastic B cells is stimulated strongly by interleukin-2. *Haematologica* *88*, 1002–1012.
- Golay, J., Roit, F.D., Bologna, L., Ferrara, C., Leusen, J.H., Rambaldi, A., Klein, C., and Introna, M. (2013). Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. *Blood* *122*, 3482–3491.
- Goldenberg, D.M., Rossi, E.A., Stein, R., Cardillo, T.M., Czuczman, M.S., Hernandez-Ilizaliturri, F.J., Hansen, H.J., and Chang, C.-H. (2009). Properties and structure-function relationships of velutuzumab (hA20), a humanized anti-CD20 monoclonal antibody. *Blood* *113*, 1062–1070.
- Gould, H.J., and Sutton, B.J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 205–217.
- Greenough, A., and Dave, S.S. (2014). New clues to the molecular pathogenesis of Burkitt lymphoma revealed through next-generation sequencing: *Curr. Opin. Hematol.* *21*, 326–332.
- Greeve, J., Philipsen, A., Krause, K., Klapper, W., Heidorn, K., Castle, B.E., Janda, J., Marcu, K.B., and Parwaresch, R. (2003). Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood* *101*, 3574–3580.
- Grundy, G.J., Ramon-Maiques, S., Dimitriadis, E.K., Kotova, S., Biertumpfel, C., Heymann, J.B., Steven, A.C., Gellert, M., and Yang, W. (2009). Initial Stages of V(D)J Recombination: the Organization of RAG1/2 and RSS DNA in the Post-cleavage Complex. *Mol. Cell* *35*, 217–227.
- Gump, J.M., and Thorburn, A. (2011). Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends Cell Biol.* *21*, 387–392.
- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Ostareck-Lederer, A., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., Hentze, M.W., and Ronai, Z. 'ev (2001). ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat. Cell Biol.* *3*, 325–330.
- Hallek, M. (2015). Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment: Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am. J. Hematol.* *90*, 446–460.
- Hallek, M., Fischer, K., Fingerle-Rowson, G., Fink, A., Busch, R., Mayer, J., Hensel, M., Hopfinger, G., Hess, G., von Grünhagen, U., et al. (2010). Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* *376*, 1164–1174.

- Han, J., Ding, J.-H., Byeon, C.W., Kim, J.H., Hertel, K.J., Jeong, S., and Fu, X.-D. (2011). SR Proteins Induce Alternative Exon Skipping through Their Activities on the Flanking Constitutive Exons. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 793–802.
- Han, S.P., Tang, Y.H., and Smith, R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem. J.* **430**, 379–392.
- Harjunpää, Junnikkala, and Meri (2000). Rituximab (Anti-CD20) Therapy of B-Cell Lymphomas: Direct Complement Killing is Superior to Cellular Effector Mechanisms. *Scand. J. Immunol.* **51**, 634–641.
- Hasselblom, S., Hansson, U., Olsson, M., Torén, L., Bergström, A., Nilsson-Ehle, H., and Andersson, P.-O. (2010). High immunohistochemical expression of p-AKT predicts inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Br. J. Haematol.* **149**, 560–568.
- Hatami, R., Sieuwerts, A.M., Izadmehr, S., Yao, Z., Qiao, R.F., Papa, L., Look, M.P., Smid, M., Ohlssen, J., Levine, A.C., et al. (2013). KLF6-SV1 Drives Breast Cancer Metastasis and Is Associated with Poor Survival. *Sci. Transl. Med.* **5**, 169ra12–ra169ra12.
- Havens, M.A., Duelli, D.M., and Hastings, M.L. (2013). Targeting RNA Splicing for Disease Therapy. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **4**, 247–266.
- He, X., Ee, P.L.R., Coon, J.S., and Beck, W.T. (2004). Alternative Splicing of the Multidrug Resistance Protein 1/ATP Binding Cassette Transporter Subfamily Gene in Ovarian Cancer Creates Functional Splice Variants and Is Associated with Increased Expression of the Splicing Factors PTB and SRp20. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4652–4660.
- Hennig, C., Ilginus, C., Boztug, K., Skokowa, J., Marodi, L., Szaflarska, A., Sass, M., Pignata, C., Kilic, S.S., Caragol, I., et al. (2014). High-content cytometry and transcriptomic biomarker profiling of human B-cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 172–180.e10.
- Henry, C., Deschamps, M., Rohrlich, P.-S., Pallandre, J.-R., Rémy-Martin, J.-P., Callanan, M., Traverse-Glehen, A., GrandClément, C., Garnache-Ottou, F., Gressin, R., et al. (2010). Identification of an alternative CD20 transcript variant in B-cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance. *Blood* **115**, 2420–2429.
- Hertel, K.J. (2008). Combinatorial Control of Exon Recognition. *J. Biol. Chem.* **283**, 1211–1215.
- Hiraga, J., Tomita, A., Sugimoto, T., Shimada, K., Ito, M., Nakamura, S., Kiyoi, H., Kinoshita, T., and Naoe, T. (2009). Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood* **113**, 4885–4893.
- Hofle, M., Linthicum, D.S., and Ioerger, T. (2000). Analysis of diversity of nucleotide and amino acid distributions in the VD and DJ joining regions in Ig heavy chains. *Mol. Immunol.* **37**, 827–835.
- Hong, D.S., Kurzrock, R., Naing, A., Wheler, J.J., Falchook, G.S., Schiffman, J.S., Faulkner, N., Pilat, M.J., O'Brien, J., and LoRusso, P. (2013). A phase I, open-label, single-arm, dose-escalation study of E7107, a precursor messenger ribonucleic acid (pre-mRNA) splicesome inhibitor administered intravenously on days 1 and 8 every 21 days to patients with solid tumors. *Invest. New Drugs* **32**, 436–444.

- van der Houven van Oordt, W., Diaz-Meco, M.T., Lozano, J., Krainer, A.R., Moscat, J., and Cáceres, J.F. (2000). The Mkk3/6-p38–Signaling Cascade Alters the Subcellular Distribution of Hnnp A1 and Modulates Alternative Splicing Regulation. *J. Cell Biol.* *149*, 307–316.
- Hu, Y., Ericsson, I., Doseth, B., Liabakk, N.B., Krokan, H.E., and Kavli, B. (2014). Activation-induced cytidine deaminase (AID) is localized to subnuclear domains enriched in splicing factors. *Exp. Cell Res.* *322*, 178–192.
- Idenoue, S., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Sato, Y., Tamura, Y., Hariu, H., Yamamoto, M., Kurotaki, T., Tsuruma, T., Asanuma, H., et al. (2005). A Potent Immunogenic General Cancer Vaccine That Targets Survivin, an Inhibitor of Apoptosis Proteins. *Clin. Cancer Res.* *11*, 1474–1482.
- Jang, S.-W., Liu, X., Fu, H., Rees, H., Yepes, M., Levey, A., and Ye, K. (2009). Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 Mediates Cell Cycle and Cell Death in Neurons. *J. Biol. Chem.* *284*, 24512–24525.
- Jares, P., and Campo, E. (2008). Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* *142*, 149–165.
- Jazirehi, A.R., Gan, X.-H., Vos, S.D., Emmanouilides, C., and Bonavida, B. (2003). Rituximab (anti-CD20) selectively modifies Bcl-xL and apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) expression and sensitizes human non-Hodgkin's lymphoma B cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* *2*, 1183–1193.
- Jazirehi, A.R., Vega, M.I., Chatterjee, D., Goodglick, L., and Bonavida, B. (2004). Inhibition of the Raf–MEK1/2–ERK1/2 Signaling Pathway, Bcl-xL Down-Regulation, and Chemosensitization of Non-Hodgkin's Lymphoma B Cells by Rituximab. *Cancer Res.* *64*, 7117–7126.
- Jilani, I., O'Brien, S., Manshuri, T., Thomas, D.A., Thomazy, V.A., Imam, M., Naeem, S., Verstovsek, S., Kantarjian, H., Giles, F., et al. (2003). Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *102*, 3514–3520.
- Kalantari-Dehaghi, M., Anhalt, G.J., Camilleri, M.J., Chernyavsky, A.I., Chun, S., Felgner, P.L., Jasinskas, A., Leiferman, K.M., Liang, L., Marchenko, S., et al. (2013). Pemphigus Vulgaris Autoantibody Profiling by Proteomic Technique. *PLoS ONE* *8*.
- Kaminski, M.S., Zasadny, K.R., Francis, I.R., Milik, A.W., Ross, C.W., Moon, S.D., Crawford, S.M., Burgess, J.M., Petry, N.A., and Butchko, G.M. (1993). Radioimmunotherapy of B-cell lymphoma with [131I]anti-B1 (anti-CD20) antibody. *N. Engl. J. Med.* *329*, 459–465.
- Kappos, L., Li, D., Calabresi, P.A., O'Connor, P., Bar-Or, A., Barkhof, F., Yin, M., Leppert, D., Glanzman, R., Tinbergen, J., et al. (2011). Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* *378*, 1779–1787.
- Kennedy, G., Komano, J., and Sugden, B. (2003). Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 14269–14274.

Kim, J., Park, R.Y., Chen, J.-K., Kim, J., Jeong, S., and Ohn, T. (2014). Splicing factor SRSF3 represses the translation of programmed cell death 4 mRNA by associating with the 5'-UTR region. *Cell Death Differ.* **21**, 481–490.

Kim, J.H., Kim, W.S., and Park, C. (2013). Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 increases genomic instability through Egr-1-mediated up-regulation of activation-induced cytidine deaminase in B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **54**, 2035–2040.

Klausz, K., Berger, S., Lammerts van Bueren, J.J., Derer, S., Lohse, S., Dechant, M., van de Winkel, J.G.J., Peipp, M., Parren, P.W.H.I., and Valerius, T. (2011). Complement-mediated tumor-specific cell lysis by antibody combinations targeting epidermal growth factor receptor (EGFR) and its variant III (EGFRvIII). *Cancer Sci.* **102**, 1761–1768.

Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* **7**, 773–782.

Klinck, R., Bramard, A., Inkel, L., Dufresne-Martin, G., Gervais-Bird, J., Madden, R., Paquet, É.R., Koh, C., Venables, J.P., Prinos, P., et al. (2008). Multiple Alternative Splicing Markers for Ovarian Cancer. *Cancer Res.* **68**, 657–663.

van der Kolk, L.E., Evers, L.M., Omene, C., Lens, S.M.A., Lederman, S., van Lier, R. a. W., van Oers, M.H.J., and Eldering, E. (2002). CD20-induced B cell death can bypass mitochondria and caspase activation. *Leukemia* **16**, 1735–1744.

Koncz, C., deJong, F., Villacorta, N., Szakonyi, D., and Koncz, Z. (2012). The Spliceosome-Activating Complex: Molecular Mechanisms Underlying the Function of a Pleiotropic Regulator. *Front. Plant Sci.* **3**.

Krueger, K.E., and Srivastava, S. (2006). Posttranslational Protein Modifications Current Implications for Cancer Detection, Prevention, and Therapeutics. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 1799–1810.

Krzewski, K., and Coligan, J.E. (2012). Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front. Immunol.* **3**.

Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 251–262.

Kvissel, A.-K., Ørstavik, S., Eikvar, S., Brede, G., Jahnsen, T., Collas, P., Akusjärvi, G., and Skålhegg, B.S. (2007). Involvement of the catalytic subunit of protein kinase A and of HA95 in pre-mRNA splicing. *Exp. Cell Res.* **313**, 2795–2809.

Landau, D.A., and Wu, C.J. (2013). Chronic lymphocytic leukemia: molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics. *Genome Med.* **5**, 47.

LeFave, C.V., Squatrito, M., Vorlova, S., Rocco, G.L., Brennan, C.W., Holland, E.C., Pan, Y.-X., and Cartegni, L. (2011). Splicing factor hnRNPH drives an oncogenic splicing switch in gliomas. *EMBO J.* **30**, 4084–4097.

Lev Maor, G., Yearim, A., and Ast, G. The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends Genet.*

- Li, H., Ayer, L.M., Lytton, J., and Deans, J.P. (2003). Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 278, 42427–42434.
- Li, H., Ayer, L.M., Polyak, M.J., Mutch, C.M., Petrie, R.J., Gauthier, L., Shariat, N., Hendzel, M.J., Shaw, A.R., Patel, K.D., et al. (2004). The CD20 calcium channel is localized to microvilli and constitutively associated with membrane rafts: antibody binding increases the affinity of the association through an epitope-dependent cross-linking-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 279, 19893–19901.
- Liang, W.-W., and Cheng, S.-C. (2015). A novel mechanism for Prp5 function in prespliceosome formation and proofreading the branch site sequence. *Genes Dev.* 29, 81–93.
- Liao, W.-T., Liu, J.-L., Wang, Z.-G., Cui, Y.-M., Shi, L., Li, T.-T., Zhao, X.-H., Chen, X.-T., Ding, Y.-Q., and Song, L.-B. (2013). High expression level and nuclear localization of Sam68 are associated with progression and poor prognosis in colorectal cancer. *BMC Gastroenterol.* 13, 126.
- Lim, S.H., and Levy, R. (2014). Translational Medicine in Action: Anti-CD20 Therapy in Lymphoma. *J. Immunol.* 193, 1519–1524.
- Lim, S.H., Vaughan, A.T., Ashton-Key, M., Williams, E.L., Dixon, S.V., Chan, H.T.C., Beers, S.A., French, R.R., Cox, K.L., Davies, A.J., et al. (2011). Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. *Blood* 118, 2530–2540.
- Liu, H.-X., Cartegni, L., Zhang, M.Q., and Krainer, A.R. (2001). A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat. Genet.* 27, 55–58.
- Liu, P., Begley, M., Michowski, W., Inuzuka, H., Ginzberg, M., Gao, D., Tsou, P., Gan, W., Papa, A., Kim, B.M., et al. (2014). Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. *Nature* 508, 541–545.
- Lopez, J., and Tait, S.W.G. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br. J. Cancer* 112, 957–962.
- Lu, T.-X., Liang, J.-H., Miao, Y., Fan, L., Wang, L., Qu, X.-Y., Cao, L., Gong, Q.-X., Wang, Z., Zhang, Z.-H., et al. (2015). Epstein-Barr virus positive diffuse large B-cell lymphoma predict poor outcome, regardless of the age. *Sci. Rep.* 5, 12168.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 741–752.
- Majerciak, V., Lu, M., Li, X., and Zheng, Z.-M. (2014). Attenuation of the suppressive activity of cellular splicing factor SRSF3 by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein is required for RNA splicing. *RNA N. Y. N* 20, 1747–1758.
- Maloney, D.G., Liles, T.M., Czerwinski, D.K., Waldichuk, C., Rosenberg, J., Grillo-Lopez, A., and Levy, R. (1994). Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood* 84, 2457–2466.

- Maloney, D.G., Grillo-López, A.J., White, C.A., Bodkin, D., Schilder, R.J., Neidhart, J.A., Janakiraman, N., Foon, K.A., Liles, T.M., Dallaire, B.K., et al. (1997). IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90, 2188–2195.
- Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Gressin, R., Molens, J.-P., Jacob, M.-C., Sotto, J.-J., Leroux, D., Bensa, J.-C., and Plumas, J. (2003). In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101, 949–954.
- Martín-Subero, J.I., Harder, L., Gesk, S., Schlegelberger, B., Grote, W., Martinez-Climent, J.A., Dyer, M.J.S., Novo, F.J., Calasanz, M.J., and Siebert, R. (2002). Interphase FISH assays for the detection of translocations with breakpoints in immunoglobulin light chain loci. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 98, 470–474.
- Masuko, K., Okazaki, S., Satoh, M., Tanaka, G., Ikeda, T., Torii, R., Ueda, E., Nakano, T., Danbayashi, M., Tsuruoka, T., et al. (2012). Anti-Tumor Effect against Human Cancer Xenografts by a Fully Human Monoclonal Antibody to a Variant 8-Epitope of CD44R1 Expressed on Cancer Stem Cells. *PLoS ONE* 7.
- Matter, N., Herrlich, P., and König, H. (2002). Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* 420, 691–695.
- Mattson, M.P., and Chan, S.L. (2003). Calcium orchestrates apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 5, 1041–1043.
- Maul, R.W., Saribasak, H., Martomo, S.A., McClure, R.L., Yang, W., Vaisman, A., Gramlich, H.S., Schatz, D.G., Woodgate, R., Wilson, D.M., et al. (2011). Uracil residues dependent on the deaminase AID in immunoglobulin gene variable and switch regions. *Nat. Immunol.* 12, 70–76.
- Mayeda, A., and Krainer, A.R. (1992). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 68, 365–375.
- McLaughlin, P., Grillo-López, A.J., Link, B.K., Levy, R., Czuczman, M.S., Williams, M.E., Heyman, M.R., Bence-Bruckler, I., White, C.A., Cabanillas, F., et al. (1998). Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 16, 2825–2833.
- Meggendorfer, M., Kern, W., Haferlach, C., Haferlach, T., and Schnittger, S. (2013). SOX11 overexpression is a specific marker for mantle cell lymphoma and correlates with t(11;14) translocation, CCND1 expression and an adverse prognosis. *Leukemia* 27, 2388–2391.
- Mercatante, D.R., Mohler, J.L., and Kole, R. (2002). Cellular Response to an Antisense-mediated Shift of Bcl-x Pre-mRNA Splicing and Antineoplastic Agents. *J. Biol. Chem.* 277, 49374–49382.
- Merdzhanova, G., Edmond, V., De Seranno, S., Van den Broeck, A., Corcos, L., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S., and Eymin, B. (2008). E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ.* 15, 1815–1823.
- Möhlmann, S., Mathew, R., Neumann, P., Schmitt, A., Lührmann, R., and Ficner, R. (2014). Structural and functional analysis of the human spliceosomal DEAD-box helicase Prp28. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 70, 1622–1630.

- Mollinedo, F., and Gajate, C. (2015). Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv. Biol. Regul.* 57, 130–146.
- Morabito, F., Gentile, M., Seymour, J.F., and Polliack, A. (2015). Ibrutinib, idelalisib and obinutuzumab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: three new arrows aiming at the target. *Leuk. Lymphoma* 1–7.
- Morrison, A., Chekaluk, Y., Bacares, R., Ladanyi, M., and Zhang, L. (2015). BAP1 Missense Mutation c.2054 A>T (p.E685V) Completely Disrupts Normal Splicing through Creation of a Novel 5' Splice Site in a Human Mesothelioma Cell Line. *PLoS ONE* 10, e0119224.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase (AID), a Novel Member of the RNA-editing Deaminase Family in Germinal Center B Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18470–18476.
- Mysler, E.F., Spindler, A.J., Guzman, R., Bijl, M., Jayne, D., Furie, R.A., Houssiau, F.A., Drappa, J., Close, D., Maciuga, R., et al. (2013). Efficacy and safety of ocrelizumab in active proliferative lupus nephritis: results from a randomized, double-blind, phase III study. *Arthritis Rheum.* 65, 2368–2379.
- Nadler, L.M., Ritz, J., Hardy, R., Pesando, J.M., Schlossman, S.F., and Stashenko, P. (1981). A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin. *J. Clin. Invest.* 67, 134–140.
- Nakatsugawa, M., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Asanuma, H., Takahashi, A., Inoda, S., Kiriya, K., Nakazawa, E., Harada, K., Takasu, H., et al. (2009). Novel spliced form of a lens protein as a novel lung cancer antigen, Lentsin splicing variant 4. *Cancer Sci.* 100, 1485–1493.
- Naro, C., and Sette, C. (2013a). Phosphorylation-Mediated Regulation of Alternative Splicing in Cancer. *Int. J. Cell Biol.* 2013, 151839.
- Naro, C., and Sette, C. (2013b). Phosphorylation-Mediated Regulation of Alternative Splicing in Cancer. *Int. J. Cell Biol.* 2013.
- Nichols, R.C., Wang, X.W., Tang, J., Hamilton, B.J., High, F.A., Herschman, H.R., and Rigby, W.F.C. (2000). The RGG Domain in hnRNP A2 Affects Subcellular Localization. *Exp. Cell Res.* 256, 522–532.
- Nilsen, T.W. (2003). The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays* 25, 1147–1149.
- Niwa, R., Sakurada, M., Kobayashi, Y., Uehara, A., Matsushima, K., Ueda, R., Nakamura, K., and Shitara, K. (2005). Enhanced Natural Killer Cell Binding and Activation by Low-Fucose IgG1 Antibody Results in Potent Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Induction at Lower Antigen Density. *Clin. Cancer Res.* 11, 2327–2336.
- Nowak, D.G., Woolard, J., Amin, E.M., Konopatskaya, O., Saleem, M.A., Churchill, A.J., Ladomery, M.R., Harper, S.J., and Bates, D.O. (2008). Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J. Cell Sci.* 121, 3487–3495.

Nozaki, Y., Mitsumori, T., Yamamoto, T., Kawashima, I., Shobu, Y., Hamanaka, S., Nakajima, K., Komatsu, N., and Kirito, K. (2013). Rituximab activates Syk and AKT in CD20-positive B cell lymphoma cells dependent on cell membrane cholesterol levels. *Exp. Hematol.* *41*, 687–696.e1.

Odegard, V.H., and Schatz, D.G. (2006). Targeting of somatic hypermutation. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 573–583.

O’Keefe, T.L., Williams, G.T., Batista, F.D., and Neuberger, M.S. (1999). Deficiency in CD22, a B Cell–specific Inhibitory Receptor, Is Sufficient to Predispose to Development of High Affinity Autoantibodies. *J. Exp. Med.* *189*, 1307–1313.

Oltean, S., and Bates, D.O. (2013). Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene*.

Oscier, D.G., Rose-Zerilli, M.J.J., Winkelmann, N., Castro, D.G. de, Gomez, B., Forster, J., Parker, H., Parker, A., Gardiner, A., Collins, A., et al. (2013). The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* *121*, 468–475.

Packard, T.A., and Cambier, J.C. (2013). B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000Prime Rep.* *5*.

Pal, S., Gupta, R., and Davuluri, R.V. (2012). Alternative transcription and alternative splicing in cancer. *Pharmacol. Ther.* *136*, 283–294.

Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., and Blencowe, B.J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* *40*, 1413–1415.

Pao, L.I., Lam, K.-P., Henderson, J.M., Kutok, J.L., Alimzhanov, M., Nitschke, L., Thomas, M.L., Neel, B.G., and Rajewsky, K. (2007). B Cell-Specific Deletion of Protein-Tyrosine Phosphatase Shp1 Promotes B-1a Cell Development and Causes Systemic Autoimmunity. *Immunity* *27*, 35–48.

Park, S.-R. (2012). Activation-induced Cytidine Deaminase in B Cell Immunity and Cancers. *Immune Netw.* *12*, 230–239.

Pasqualucci, L., Guglielmino, R., Houldsworth, J., Mohr, J., Aoufouchi, S., Polakiewicz, R., Chaganti, R.S.K., and Dalla-Favera, R. (2004). Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells. *Blood* *104*, 3318–3325.

Pasqualucci, L., Kitaura, Y., Gu, H., and Dalla-Favera, R. (2006). PKA-mediated phosphorylation regulates the function of activation-induced deaminase (AID) in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 395–400.

Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., Honjo, T., Morse, H.C., Nussenzweig, M.C., and Dalla-Favera, R. (2008). AID is required for germinal center–derived lymphomagenesis. *Nat. Genet.* *40*, 108–112.

Patel, A.A., and Steitz, J.A. (2003). Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 960–970.

Pawluczkwycz, A.W., Beurskens, F.J., Beum, P.V., Lindorfer, M.A., Winkel, J.G.J. van de, Parren, P.W.H.I., and Taylor, R.P. (2009). Binding of Submaximal C1q Promotes Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC)

of B Cells Opsonized with Anti-CD20 mAbs Ofatumumab (OFA) or Rituximab (RTX): Considerably Higher Levels of CDC Are Induced by OFA than by RTX. *J. Immunol.* **183**, 749–758.

Pedersen, A.E., Jungersen, M.B., and Pedersen, C.D. (2011). Monocytes mediate shaving of B-cell-bound anti-CD20 antibodies. *Immunology* **133**, 239–245.

Peinado, H., Lavotshkin, S., and Lyden, D. (2011). The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin. Cancer Biol.* **21**, 139–146.

Petrie, R.J., and Deans, J.P. (2002). Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 2886–2891.

Poddar, S., Eul, J., and Patzel, V. (2014). Homologous SV40 RNA trans-splicing: Special case or prime example of viral RNA trans-splicing? *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **10**, 51–57.

Polyak, M.J., Tailor, S.H., and Deans, J.P. (1998). Identification of a Cytoplasmic Region of CD20 Required for Its Redistribution to a Detergent-Insoluble Membrane Compartment. *J. Immunol.* **161**, 3242–3248.

Polyak, M.J., Li, H., Shariat, N., and Deans, J.P. (2008). CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **283**, 18545–18552.

Pott, C., Brüggemann, M., Ritgen, M., van der Velden, V.H.J., van Dongen, J.J.M., and Kneba, M. (2013). MRD detection in B-cell non-Hodgkin lymphomas using Ig gene rearrangements and chromosomal translocations as targets for real-time quantitative PCR. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **971**, 175–200.

Press, O.W., Howell-Clark, J., Anderson, S., and Bernstein, I. (1994). Retention of B-cell-specific monoclonal antibodies by human lymphoma cells. *Blood* **83**, 1390–1397.

Puiggros, A., Blanco, G., and Espinet, B. (2014). Genetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia: Where We Are and Where We Go. *BioMed Res. Int.* **2014**.

Puttaraju, M., Jamison, S.F., Mansfield, S.G., Garcia-Blanco, M.A., and Mitchell, L.G. (1999). Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nat. Biotechnol.* **17**, 246–252.

te Raa, G.D., Derks, I. a. M., Navrkalova, V., Skowronska, A., Moerland, P.D., van Laar, J., Oldreive, C., Monsuur, H., Trbusek, M., Malcikova, J., et al. (2014). The impact of SF3B1 mutations in CLL on the DNA-damage response. *Leukemia*.

Ranieri, D., Belleudi, F., Magenta, A., and Torrisi, M.R. (2015). HPV16 E5 expression induces switching from FGFR2b to FGFR2c and epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **137**, 61–72.

Rasul, E., Salamon, D., Nagy, N., Leveau, B., Banati, F., Szenthe, K., Koroknai, A., Minarovits, J., Klein, G., and Klein, E. (2014). The MEC1 and MEC2 Lines Represent Two CLL Subclones in Different Stages of Progression towards Prolymphocytic Leukemia. *PLoS ONE* **9**, e106008.

Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N., and Anderson, D.R. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **83**, 435–445.

Roulland, S., Kelly, R.S., Morgado, E., Sungalee, S., Solal-Celigny, P., Colombat, P., Jouve, N., Palli, D., Pala, V., Tumino, R., et al. (2014). t(14;18) Translocation: A Predictive Blood Biomarker for Follicular Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 32, 1347–1355.

Roybal, G.A., and Jurica, M.S. (2010). Spliceostatin A inhibits spliceosome assembly subsequent to prespliceosome formation. *Nucleic Acids Res.* 38, 6664–6672.

Rubió-Casadevall, J., Borràs, J.L., Carmona-García, M.C., Ameijide, A., Gonzalez-Vidal, A., Ortiz, M.R., Bosch, R., Riu, F., Parada, D., Martí, E., et al. (2015). Correlation between mutational status and survival and second cancer risk assessment in patients with gastrointestinal stromal tumors: a population-based study. *World J. Surg. Oncol.* 13.

Ruocco, V., Ruocco, E., Lo Schiavo, A., Brunetti, G., Guerrera, L.P., and Wolf, R. (2013). Pemphigus: Etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: Facts and controversies. *Clin. Dermatol.* 31, 374–381.

Saha, A., and Robertson, E.S. (2011). Epstein-Barr virus Associated B-cell lymphomas: Pathogenesis and Clinical Outcomes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 3056–3063.

Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., et al. (2003). Notch2 Is Preferentially Expressed in Mature B Cells and Indispensable for Marginal Zone B Lineage Development. *Immunity* 18, 675–685.

Sakkas, L.I., Bogdanos, D.P., Katsiari, C., and Platsoucas, C.D. Anti-citrullinated peptides as autoantigens in rheumatoid arthritis—relevance to treatment. *Autoimmun. Rev.*

Sangodkar, J., DiFeo, A., Feld, L., Bromberg, R., Schwartz, R., Huang, F., Terzo, E.A., Choudhri, A., and Narla, G. (2009). Targeted reduction of KLF6-SV1 restores chemotherapy sensitivity in resistant lung adenocarcinoma. *Lung Cancer Amst. Neth.* 66, 292–297.

Sasaki-Haraguchi, N., Shimada, M.K., Taniguchi, I., Ohno, M., and Mayeda, A. (2012). Mechanistic insights into human pre-mRNA splicing of human ultra-short introns: Potential unusual mechanism identifies G-rich introns. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423, 289–294.

Scaffidi, C. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675–1687.

Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573–1577.

Shan, D., Ledbetter, J.A., and Press, O.W. (2000). Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 48, 673–683.

Sharma, S., Kohlstaedt, L.A., Damianov, A., Rio, D.C., and Black, D.L. (2008). Polypyrimidine tract binding protein controls the transition from exon definition to an intron defined spliceosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 183–191.

Shepard, P.J., and Hertel, K.J. (2009). The SR protein family. *Genome Biol.* 10, 242.

Shimada, K., Tomita, A., Saito, S., and Kiyoi, H. (2014). Efficacy of ofatumumab against rituximab-resistant B-CLL/SLL cells with low CD20 protein expression. *Br. J. Haematol.* 166, 455–457.

Shimoni-Sebag, A., Lebenthal-Loinger, I., Zender, L., and Karni, R. RRM1 domain of the splicing oncoprotein SRSF1 is required for MEK1-MAPK-ERK activation and cellular transformation.

Shin, C., and Manley, J.L. (2002). The SR Protein SRp38 Represses Splicing in M Phase Cells. *Cell* **111**, 407–417.

Shultz, J.C., Goehe, R.W., Wijesinghe, D.S., Murudkar, C., Hawkins, A.J., Shay, J.W., Minna, J.D., and Chalfant, C.E. (2010). Alternative splicing of Caspase 9 is modulated by the PI3K/Akt pathway via phosphorylation of SRp30a. *Cancer Res.* **70**, 9185–9196.

Siepmann, K., Skok, J., van Essen, D., Harnett, M., and Gray, D. (2001). Rewiring of CD40 is necessary for delivery of rescue signals to B cells in germinal centres and subsequent entry into the memory pool. *Immunology* **102**, 263–272.

Sinha, R., Allemand, E., Zhang, Z., Karni, R., Myers, M.P., and Krainer, A.R. (2010). Arginine Methylation Controls the Subcellular Localization and Functions of the Oncoprotein Splicing Factor SF2/ASF. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 2762–2774.

Stacchini, A., Aragno, M., Vallario, A., Alfarano, A., Circosta, P., Gottardi, D., Faldella, A., Rege-Cambrin, G., Thunberg, U., Nilsson, K., et al. (1999). MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in polyclonal transformation. *Leuk. Res.* **23**, 127–136.

Stanglmaier, M., Reis, S., and Hallek, M. (2004). Rituximab and alemtuzumab induce a nonclassic, caspase-independent apoptotic pathway in B-lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia cells. *Ann. Hematol.* **83**, 634–645.

Stark, M., Wichman, C., Avivi, I., and Assaraf, Y.G. (2009). Aberrant splicing of folypolyglutamate synthetase as a novel mechanism of antifolate resistance in leukemia. *Blood* **113**, 4362–4369.

Stark, M., Bram, E.E., Akerman, M., Mandel-Gutfreund, Y., and Assaraf, Y.G. (2011). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein H1/H2-dependent Unsplicing of Thymidine Phosphorylase Results in Anticancer Drug Resistance. *J. Biol. Chem.* **286**, 3741–3754.

Stashenko, P., Nadler, L.M., Hardy, R., and Schlossman, S.F. (1980). Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **125**, 1678–1685.

Stel, A.J., Cate, B. ten, Jacobs, S., Kok, J.W., Spierings, D.C.J., Dondorff, M., Helfrich, W., Kluin-Nelemans, H.C., Leij, L.F.M.H. de, Withoff, S., et al. (2007). Fas Receptor Clustering and Involvement of the Death Receptor Pathway in Rituximab-Mediated Apoptosis with Concomitant Sensitization of Lymphoma B Cells to Fas-Induced Apoptosis. *J. Immunol.* **178**, 2287–2295.

Stolz, C., and Schuler, M. (2009). Molecular mechanisms of resistance to Rituximab and pharmacologic strategies for its circumvention. *Leuk. Lymphoma* **50**, 873–885.

Stranzl, T., Larsen, M.V., Lund, O., Nielsen, M., and Brunak, S. (2012). The Cancer Exome Generated by Alternative mRNA Splicing Dilutes Predicted HLA Class I Epitope Density. *PLoS ONE* **7**.

van Strijp, J.A.G., van Kessel, K.P.M., and Bestebroer, J. (2014). Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Immunol.* **5**, 467.

- Sun, T., Akalin, A., Rodacker, M., and Braun, T. (2004). CD20 positive T cell lymphoma: is it a real entity? *J. Clin. Pathol.* *57*, 442–444.
- Suzuki, E., Umezawa, K., and Bonavida, B. (2007). Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene* *26*, 6184–6193.
- Suzuki, T., Kono, H., Hirose, N., Okada, M., Yamamoto, T., Yamamoto, K., and Honda, Z. (2000). Differential Involvement of Src Family Kinases in Fcγ Receptor-Mediated Phagocytosis. *J. Immunol.* *165*, 473–482.
- Svasti, S., Suwanmanee, T., Fucharoen, S., Moulton, H.M., Nelson, M.H., Maeda, N., Smithies, O., and Kole, R. (2009). RNA repair restores hemoglobin expression in IVS2–654 thalassemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 1205–1210.
- Takami, A., Saito, M., Nakao, S., Asakura, H., Nozue, T., Onoe, Y., Yachie, A., Shiobara, S., and Matsuda, T. (1998). CD20-positive T-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* *102*, 1327–1329.
- Tauro, B.J., Mathias, R.A., Greening, D.W., Gopal, S.K., Ji, H., Kapp, E.A., Coleman, B.M., Hill, A.F., Kusebauch, U., Hallows, J.L., et al. (2013). Oncogenic H-Ras Reprograms Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cell-derived Exosomal Proteins Following Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol. Cell. Proteomics* *12*, 2148–2159.
- Tayama, M., Furuhata, T., Inafuku, Y., Okita, K., Nishidate, T., Mizuguchi, T., Kimura, Y., and Hirata, K. (2011). Vascular endothelial growth factor 165b expression in stromal cells and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* *17*, 4867–4874.
- Tedder, T.F., Disteché, C.M., Louie, E., Adler, D.A., Croce, C.M., Schlossman, S.F., and Saito, H. (1989a). The gene that encodes the human CD20 (B1) differentiation antigen is located on chromosome 11 near the t(11;14)(q13;q32) translocation site. *J. Immunol.* *142*, 2555–2559.
- Tedder, T.F., Klejman, G., Schlossman, S.F., and Saito, H. (1989b). Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *142*, 2560–2568.
- Teeling, J.L., French, R.R., Cragg, M.S., Brakel, J. van den, Pluyter, M., Huang, H., Chan, C., Parren, P.W.H.I., Hack, C.E., Dechant, M., et al. (2004). Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* *104*, 1793–1800.
- Teeling, J.L., Mackus, W.J.M., Wiegman, L.J.J.M., van den Brakel, J.H.N., Beers, S.A., French, R.R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J.W., et al. (2006). The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 362–371.
- Thiery, J., Walch, M., Jensen, D.K., Martinvalet, D., and Lieberman, J. (2010). Isolation of cytotoxic T cell and NK granules and purification of their effector proteins. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Editor. Board Juan Bonifacio *Al Chapter 3*, Unit3.37.
- Tsai, P.-C., Hernandez-Ilizaliturri, F.J., Bangia, N., Olejniczak, S.H., and Czuczman, M.S. (2012). Regulation of CD20 in Rituximab-Resistant Cell Lines and B-cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* *18*, 1039–1050.

- Tsapogas, P., Zandi, S., Åhsberg, J., Zetterblad, J., Welinder, E., Jönsson, J.I., Månsson, R., Qian, H., and Sigvardsson, M. (2011). IL-7 mediates Ebf-1–dependent lineage restriction in early lymphoid progenitors. *Blood* *118*, 1283–1290.
- Turunen, J.J., Niemelä, E.H., Verma, B., and Frilander, M.J. (2013). The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *4*, 61–76.
- Turzanski, J., Daniels, I., and Haynes, A.P. (2009). Involvement of macroautophagy in the caspase-independent killing of Burkitt lymphoma cell lines by rituximab. *Br. J. Haematol.* *145*, 137–140.
- Uchida, J., Lee, Y., Hasegawa, M., Liang, Y., Bradney, A., Oliver, J.A., Bowen, K., Steeber, D.A., Haas, K.M., Poe, J.C., et al. (2004). Mouse CD20 expression and function. *Int. Immunol.* *16*, 119–129.
- Upadhyay, R., Hammerich, L., Peng, P., Brown, B., Merad, M., and Brody, J.D. (2015). Lymphoma: Immune Evasion Strategies. *Cancers* *7*, 736–762.
- Ushmorov, A., Leithäuser, F., Sakk, O., Weinhäusel, A., Popov, S.W., Möller, P., and Wirth, T. (2006). Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* *107*, 2493–2500.
- Valacca, C., Bonomi, S., Buratti, E., Pedrotti, S., Baralle, F.E., Sette, C., Ghigna, C., and Biamonti, G. (2010). Sam68 regulates EMT through alternative splicing–activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene. *J. Cell Biol.* *191*, 87–99.
- Vauchy, C., Gamonet, C., Ferrand, C., Daguindau, E., Galaine, J., Beziaud, L., Chauchet, A., Henry Dunand, C.J., Deschamps, M., Rohrlisch, P.S., et al. (2015). CD20 alternative splicing isoform generates immunogenic CD4 helper T epitopes. *Int. J. Cancer* *137*, 116–126.
- Vega, M.I., Huerta-Yepaz, S., Garban, H., Jazirehi, A., Emmanouilides, C., and Bonavida, B. (2004). Rituximab inhibits p38 MAPK activity in 2F7 B NHL and decreases IL-10 transcription: Pivotal role of p38 MAPK in drug resistance. *Oncogene* *23*, 3530–3540.
- Vega, M.I., Huerta-Yepe, S., Martinez-Paniagua, M., Martinez-Miguel, B., Hernandez-Pando, R., González-Bonilla, C.R., Chinn, P., Hanna, N., Hariharan, K., Jazirehi, A.R., et al. (2009). Rituximab-Mediated Cell Signaling and Chemo/Immuno-sensitization of Drug-Resistant B-NHL Is Independent of Its Fc Functions. *Clin. Cancer Res.* *15*, 6582–6594.
- Venables, J.P. (2004). Aberrant and Alternative Splicing in Cancer. *Cancer Res.* *64*, 7647–7654.
- Verma, D., Bais, S., Gaillard, M., and Swaminathan, S. (2010). Epstein-Barr Virus SM Protein Utilizes Cellular Splicing Factor SRp20 To Mediate Alternative Splicing. *J. Virol.* *84*, 11781–11789.
- Victora, G.D., Dominguez-Sola, D., Holmes, A.B., Deroubaix, S., Dalla-Favera, R., and Nussenzweig, M.C. (2012). Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood* *120*, 2240–2248.
- Vincent, F.B., Morand, E.F., Schneider, P., and Mackay, F. (2014). The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *10*, 365–373.

- Vlaicu, S.I., Tegla, C.A., Cudrici, C.D., Danoff, J., Madani, H., Sugarman, A., Niculescu, F., Mircea, P.A., Rus, V., and Rus, H. (2013). Role of C5b-9 complement complex and response gene to complement-32 (RGC-32) in cancer. *Immunol. Res.* 56, 109–121.
- Vockerodt, M., Yap, L.-F., Shannon-Lowe, C., Curley, H., Wei, W., Vrzalikova, K., and Murray, P.G. (2015). The Epstein–Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. *J. Pathol.* 235, 312–322.
- Vu, N.T., Park, M.A., Shultz, J.C., Goehe, R.W., Hoeflerlin, L.A., Shultz, M.D., Smith, S.A., Lynch, K.W., and Chalfant, C.E. (2013). hnRNP U Enhances Caspase-9 Splicing and Is Modulated by AKT-dependent Phosphorylation of hnRNP L. *J. Biol. Chem.* 288, 8575–8584.
- Wagner, C., Stegmaier, S., and Hänsch, G.M. (2008). Expression of granzyme B in peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN), myeloid cell lines and in PMN derived from haemopoietic stem cells in vitro. *Mol. Immunol.* 45, 1761–1766.
- Walshe, C.A., Beers, S.A., French, R.R., Chan, C.H.T., Johnson, P.W., Packham, G.K., Glennie, M.J., and Cragg, M.S. (2008). Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 16971–16984.
- Wang, L., Lawrence, M.S., Wan, Y., Stojanov, P., Sougnez, C., Stevenson, K., Werner, L., Sivachenko, A., DeLuca, D.S., Zhang, L., et al. (2011). SF3B1 and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 365, 2497–2506.
- Weng, W.-K., and Levy, R. (2001). Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 98, 1352–1357.
- Wierda, W.G., Kipps, T.J., Mayer, J., Stilgenbauer, S., Williams, C.D., Hellmann, A., Robak, T., Furman, R.R., Hillmen, P., Trneny, M., et al. (2010). Ofatumumab As Single-Agent CD20 Immunotherapy in Fludarabine-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 28, 1749–1755.
- Woof, J.M., and Kerr, M.A. (2004). IgA function – variations on a theme. *Immunology* 113, 175–177.
- Xie, J., Lee, J.-A., Kress, T.L., Mowry, K.L., and Black, D.L. (2003). Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8776–8781.
- Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., and Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 517–531.
- Yamamura, T., and Miyake, S. (2012). B-cell-directed therapy: which B cells should be targeted and how? *Immunotherapy* 4, 455–457.
- Yang, J.-H., Chiou, Y.-Y., Fu, S.-L., Shih, I.-Y., Weng, T.-H., Lin, W.-J., and Lin, C.-H. (2014). Arginine methylation of hnRNPK negatively modulates apoptosis upon DNA damage through local regulation of phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 42, 9908–9924.

Yearim, A., Gelfman, S., Shayevitch, R., Melcer, S., Glaich, O., Mallm, J.-P., Nissim-Rafinia, M., Cohen, A.-H.S., Rippe, K., Meshorer, E., et al. (2015). HP1 Is Involved in Regulating the Global Impact of DNA Methylation on Alternative Splicing. *Cell Rep.* 10, 1122–1134.

Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400, 886–891.

Zhang, L., Li, X., Hill, R.C., Qiu, Y., Zhang, W., Hansen, K.C., and Zhao, R. (2015). Brr2 plays a role in spliceosomal activation in addition to U4/U6 unwinding. *Nucleic Acids Res.* gkv062.

Zhong, X.-Y., Ding, J.-H., Adams, J.A., Ghosh, G., and Fu, X.-D. (2009). Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. *Genes Dev.* 23, 482–495.

Zhou, Z., and Fu, X.-D. (2013). Regulation of Splicing by SR proteins and SR Protein-Specific Kinases. *Chromosoma* 122, 191–207.

Zhou, Z., Qiu, J., Wen, L., Zhou, Y., Plocinik, R.M., Li, H., Hu, Q., Ghosh, G., Adams, J.A., Rosenfeld, M.G., et al. (2012). The Akt-SRPK-SR Axis Constitutes a Major Pathway in Transducing EGF Signaling to Regulate Alternative Splicing in the Nucleus. *Mol. Cell* 47, 422–433.

Zhu, J., Gong, J.Y., Goodman, O.B., Cartegni, L., Nanus, D.M., and Shen, R. (2007). Bombesin attenuates pre-mRNA splicing of glucocorticoid receptor by regulating the expression of serine-arginine protein p30c (SRp30c) in prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1087–1094.

Zuccolo, J., Bau, J., Childs, S.J., Goss, G.G., Sensen, C.W., and Deans, J.P. (2010). Phylogenetic Analysis of the MS4A and TMEM176 Gene Families. *PLoS ONE* 5.